

Aus dem Institut für chirurgische Forschung

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Detlef Barsch
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Titel der Dissertation:

**Der Smoothened-Antagonist LDE225 hemmt die Proliferation in
Gemcitabin-sensitiven und -resistenten Zelllinien des duktales
Adenokarzinoms des Pankreas**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung

des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Philip Ferstl aus Starnberg

Marburg, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

11.02.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Matthias Ocker

Korreferent: Prof. Dr. Detlef Bartsch

Zweiter Korreferent: Prof. Dr. Thomas Gress

Meiner Mutter gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung und Abstract	7
2. Einleitung.....	9
2.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC)	9
2.2 Der Hedgehog-Signalweg	10
2.3 Aktivierung des Shh-Signalwegs und seine Effekte	11
2.3.1 Die Signalkaskade vom Liganden SHH zum Effektorprotein GLI1.....	11
2.3.2 Aktivierung von GLI1 und seinen Zielgenen	12
2.3.3 Interaktionen mit anderen prominenten Signalwegen und Akteuren	13
2.3.4 Selbstregulation des Shh-Signalweges.....	14
2.4 Der Shh-Signalweg und Tumorgenese.....	15
2.4.1 Rolle des Tumorsuppressorgens <i>PTCH1</i> und des Protoonkogens <i>SMO</i>	15
2.4.2 Ligandenabhängige Aktivierung des Shh-Signalweges bei Tumorerkrankungen	16
2.5 Der Shh-Signalweg und das PDAC	17
2.5.1 Genese des PDAC und Assoziation mit der Reaktivierung des Shh-Signalweges	17
2.5.2 Tumorstroma, Desmoplasie.....	18
2.5.3 Krebsstammzellen.....	19
2.5.4 Epithelial-mesenchymale Transition.....	20
2.5.5 Chemoresistenz	20
2.6 Inhibitoren des Hh-Signalweges	21
2.6.1 Cyclopamin und niedermolekulare SMO-Antagonisten	21
2.6.2 Weitere Inhibitoren des Hh-Signalweges	22
2.7 SMO-Antagonisten im PDAC.....	23
3. Fragestellung	25
4. Material und Methoden	26
4.1 Material	26
4.2 Methoden	34
4.2.1 Zelllinien.....	34
4.2.2 Substanzen und experimentelle Grundlagen	36
4.2.3 Versuche zur zellulären Proliferation	37
4.2.4 Versuche zur Zellzyklus- und Apoptosebestimmung.....	40
4.2.5 Quantitative Echtzeit-PCR (rt-qPCR).....	42
4.2.5.1 Vorbereitung der rt-qPCR	42

4.2.5.2 Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR.....	43
4.2.5.3 Auswertung der qPCR-Daten	45
4.2.6 Western Blot	46
4.2.7 Statistische Auswertung	49
5. Ergebnisse	50
5.1 Zelluläre Proliferation.....	50
5.1.1 Manuelle Zellzählung nach Behandlung mit LDE225.....	50
5.1.1.1 Manuelle Zellzählung wt-Capan-1	50
5.1.1.2 Manuelle Zellzählung GR-Capan-1	50
5.1.1.3 Manuelle Zellzählung wt-Panc-1.....	51
5.1.2. Zelluläre Proliferation im xCELLigence RTCA Analyser	52
5.1.2.1 Proliferation unbehandelter Capan-1 und Panc-1 Zellen	52
5.1.2.2 Proliferation von Capan-1 Zellen unter LDE225.....	53
5.1.2.3 Proliferation von Panc-1 Zellen unter LDE225	54
5.1.2.4 Bestimmung der Wirksamkeit von LDE225 anhand der IC ₅₀	56
5.1.2.5 Kombinationstherapie von LDE225 und Gemcitabin in GR-Zellen	56
5.1.2.6 Proliferation bei LDE225-proportionalen Konzentrationen von DMSO	57
5.2 Analyse von Apoptose und Zellzyklus.....	58
5.2.1 Apoptose nach Monotherapie mit LDE225 in Capan-1	59
5.2.2 Apoptose nach Monotherapie mit LDE225 in Panc-1.....	60
5.2.3 LDE225-Monotherapie und Kombinationstherapie aus LDE225 und Gemcitabin	60
5.2.3.1 Zellzyklus in Capan-1-Zellen 72 h nach LDE225- und Gemcitabinbehandlung	61
5.2.3.2 Zellzyklus in Panc-1-Zellen 72 h nach Behandlung mit LDE225 und Gemcitabin ...	62
5.3 Baseline-Genexpression des Shh-Signalwegs ohne Behandlung mit LDE225	65
5.3.1 Charakterisierung der Baseline-Expression in Capan-1- und Panc-1-Zellen.....	65
5.3.2 Assoziation der Baseline-Expression von <i>SMO</i> mit der IC ₅₀ von LDE225.....	66
5.3.3 Zellwachstum und Aktivität des Hedgehog-Signalwegs	66
5.4 qPCR-Analyse des Shh-Signalwegs nach Behandlung mit LDE225	67
5.4.1 Genexpression in LDE225-behandelten wt-und GR-Capan-1-Zellen.....	67
5.4.2 Genexpression in LDE225-behandelten wt-und GR-Panc-1-Zellen	69
5.4.3 Verlauf der Hh-Aktivität nach Behandlung mit LDE225.....	70
5.5 Western Blot-Analyse der Expression von GLI1	70
5.5.1 GLI1-Expression nach Behandlung mit 50 µM LDE225 in Capan-1-Zellen.....	70
5.5.2 GLI1-Expression nach Behandlung mit 30 µM LDE225 in Panc-1-Zellen	71
6. Diskussion.....	73

6.1 Zu den Methoden der Arbeit.....	74
6.1.1 Versuche zu Proliferation und Wachstum	74
6.1.2 Versuche zu Zellzyklus und Apoptose.....	74
6.1.3 Western Blot-Analyse der GLI1-Proteinexpression	76
6.2 Der proliferationshemmende Effekt von LDE225 in Capan-1- und Panc-1-Zellen	76
6.2.1 Analyse des Proliferationsverhaltens anhand der IC ₅₀	76
6.2.2 Klinische Anwendbarkeit von LDE225 beim PDAC.....	78
6.2.3 Der Einfluss von LDE225 auf Gemcitabinresistenz	78
6.3 Veränderungen des Zellzyklus durch Behandlung mit LDE225 und/oder Gemcitabin	79
6.4 Baseline-Expression der Shh-Gene in wt- und GR-Zellen	81
6.4.1 Hh-Aktivität in wt- und GR-Zellen	81
6.4.2 Expression von <i>SMO</i> und <i>SHH</i> in GR-Zellen	81
6.5 qPCR nach Behandlung mit LDE225	82
6.5.1 Beurteilung des Hh-Aktivierungsgrades	82
6.5.2 Expression von <i>SMO</i> und Assoziation mit der IC ₅₀ von LDE225.....	83
6.5.3 Expression von <i>SHH</i> , Kodierer des parakrinen Stimulators <i>SHH</i>	84
6.6 GLI1-Proteinexpression nach Behandlung mit LDE225	85
6.6.1 Vergleichende Beobachtungen der vorliegenden Arbeit	85
6.6.2 GLI1 als möglicher Indikator sekundärer zellulärer Antworten auf LDE225.....	86
6.7 Zusammenfassung.....	88
6.8 Limitierungen der Arbeit	88
6.8 Ausblick.....	89
7. Literaturverzeichnis.....	91
8. Anhang	100
8.1 Abbildungsverzeichnis	100
8.2 Tabellenverzeichnis	101
8.3 Abkürzungsverzeichnis	102
8.4 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse.....	104
8.5 Lebenslauf.....	117
8.6 Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	119
8.7 Eigene Veröffentlichungen zum Thema	120
8.8 Ehrenwörtliche Erklärung	121
8.9 Danksagung	122

1. Zusammenfassung und Abstract

Zusammenfassung

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist eine der am schlechtesten therapierbaren Krebserkrankungen und verfügt über eine äußerst ungünstige Prognose. Dies liegt - unter anderem - an einer inhärenten oder sich rasch entwickelnden Chemoresistenz des PDAC gegen das Standard-Chemotherapeutikum Gemcitabin. In den vergangenen Jahren zeigte die Substanzklasse der Hedgehog (Hh)-Inhibitoren vielversprechende Ansätze in *in vitro*-Versuchen sowie im xenotransplantierten Mausmodell verschiedenster Tumorentitäten, und mehrere Wirkstoffe befinden sich seit kurzem auch in klinischer Erprobung. LDE225 ist ein niedermolekularer Smoothed (SMO)-Antagonist, der schon in einigen Veröffentlichungen zu pankreatischen Tumoren zur Anwendung kam.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der SMO-Inhibierung mit LDE225 auf die Tumorzelllinien Capan-1 und Panc-1 untersucht. Explizit wurde die Fragestellung behandelt, inwiefern die Chemoresistenz gegenüber Gemcitabin einen Einfluss auf die Effektivität einer Therapie mit SMO-Inhibitoren hat. Es wurden hierfür kommerziell verfügbare, Gemcitabin-sensitiven wildtyp-Zelllinien (wt-Capan-1 und wt-Panc-1), sowie eigens gezüchtete Gemcitabin-resistente Zelllinien (GR-Capan-1 und GR-Panc-1) verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass LDE225 in ausreichend hoher Dosis die Proliferation der verwendeten Zelllinien hemmt. In den chemoresistenten Zelllinien zeigte sich eine veränderte Wirksamkeit von LDE225 im Vergleich zu wt-Zellen. SMO-Inhibition hatte in GR-Zellen keinen sensitivierenden Effekt gegenüber Gemcitabin. Der Einsatz von LDE225 führte nicht zu vermehrter Apoptose, doch es konnte eine Erhöhung der G1-Phase des Zellzyklus beobachtet werden. Mit Hilfe von quantitativer Analyse der Genexpression konnten Modifizierungen des Hh-Signalwegs nach SMO-Antagonisierung beschrieben werden.

Während sich zahlreiche Veröffentlichungen den Effekten von Hh-Inhibitoren auf das Tumorstroma oder Krebsstammzellen widmen, untersucht die vorliegende Arbeit detailliert die Behandlung von Tumorzellen mit einem niedermolekularen SMO-Antagonisten und stellt Wechselwirkungen zwischen erworbener Chemoresistenz und

der Aktivität des Hh-Signalweges im PDAC dar. Ziel der Arbeit ist es, Einblick in ein komplexes und bisher wenig beachtetes Gebiet zu gewinnen.

Abstract

The treatment of the ductal adenocarcinoma of the pancreas (PDAC) is one of the least successful of all cancers, causing it to range amongst the cancer diseases with the grimmest prognosis. This is partly due to inherent or quickly emerging chemoresistance of the PDAC against Gemcitabine, the current standard of treatment. In recent years, hedgehog (Hh) inhibitors have shown promising results in *in vitro*-trials and mice xenografts, resulting in further testing of several substances in clinical trials that are currently underway. LDE225 is a low-molecular antagonist of Smoothened (SMO) and has already been used in several publications on pancreatic cancer.

In the present thesis, the effects of SMO inhibition with LDE225 on the tumor cell lines Capan-1 and Panc-1 were investigated. One particular question was how chemoresistance would have an impact on the efficacy of the treatment with a SMO inhibitor. We used both abovementioned commercially available wildtype (wt) cell lines which are sensitive against Gemcitabine, and the same cell lines adapted to Gemcitabine (gemcitabine-resistant, GR) which were bred in our laboratory.

It was shown that sufficient dosing of LDE225 is inhibiting proliferation in all cell lines used. Acquired chemoresistance resulted in altered efficacy of LDE225 compared to wt cells. SMO inhibition did not increase sensitivity against Gemcitabine in GR cells. Use of LDE225 did not lead to an increase of apoptosis, but we could observe a shift in the G1 fraction. Gene expression analysis was conducted to describe mechanisms of Hh pathway modification after SMO inhibition in the cell lines used.

Numerous publications have dealt with the effects of Hh inhibitors on tumorous stroma or cancer stem cells. The present thesis is explicitly focused on the treatment of the tumor cells with a low-molecular SMO antagonist and displays feedback mechanisms between acquired chemoresistance and Hh activity of the PDAC. It aims to gain insight to a complex topic that has not yet been thoroughly investigated.

2. Einleitung

2.1 Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC)

Das Pankreaskarzinom ist eine der tödlichsten Krebserkrankungen weltweit. Es ist gekennzeichnet durch rasches und infiltratives Wachstum, frühzeitige Metastasierung und spätes Auftreten von Symptomen. 80% der Pankreaskarzinome werden im metastasierten Stadium diagnostiziert, in dem ein operativ-kurativer Therapieansatz nicht mehr möglich ist. Es ist der vierthäufigste krebsassoziierte Todesgrund in den USA, wo für das Jahr 2012 43.920 Neuerkrankungen sowie 37.390 Todesfälle prognostiziert wurden; die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt dort 6% (Siegel et al., 2012). In Deutschland lag die Inzidenz 2010 bei 16.000 Neuerkrankungen, und das Robert-Koch-Institut prognostiziert für 2014 17.400 neue Fälle; auch hierzulande wird es mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 8% sowie 7.537 Sterbefällen im Jahr 2010 als vierthäufigste krebsassoziierte Todesursache geführt (Kaatsch et al., 2013). Das mittlere Erkrankungsalter liegt in der achten Dekade, Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen. Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist mit 95% die häufigste Form des Pankreaskarzinoms (Kaatsch et al., 2012).

Es sind familiäre Formen des PDAC wie zum Beispiel im Rahmen der Zystischen Fibrose oder des Peutz-Jeghers-Syndroms bekannt. In der Mehrzahl der Fälle tritt es jedoch bei älteren Patienten ohne assoziierte Grunderkrankung auf (Lowenfels and Maisonneuve, 2006). Risikofaktoren sind hier in erster Linie Nikotin, aber auch Adipositas, Alkoholkonsum und die chronische Pankreatitis. Bei der sporadischen Entstehung der Krankheit wird neben den Umweltfaktoren aber auch ein genetischer Hintergrund vermutet (AWMF et al., 2013; Lowenfels and Maisonneuve, 2006).

Die kurative Resektion beinhaltet die radikale Pankreatikoduodenektomie und erhöht die 5-Jahres-Überlebensrate auf 18% (Winter et al., 2006). Wenn eine Resektion in kurativer Absicht nicht möglich ist, sind alle chemotherapeutischen Schemata als palliativ anzusehen. Die bislang verfügbaren medikamentösen Therapieschemata basieren auf dem Antimetaboliten Gemcitabin und führen zu einer symptomatischen und klinischen Besserung (Burris et al., 1997), verlängern jedoch das 5-Jahres-Überleben nicht. Unter dem neu entwickelten Therapieregime mit FOLFIRINOX, einer Kombination aus Oxaliplatin, Irinotecan, Fluorouracil und Leucovorin, hat sich das

mediane Überleben von 6,8 Monate auf 11,1 Monate verlängert, während sich die 5-Jahres-Überlebensrate jedoch nicht besserte. Diese Therapie geht darüber hinaus mit deutlich erhöhten Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen oder Ermattung einher und ist nur für Patienten mit gutem Performance-Status empfehlenswert (Conroy et al., 2011). Mit dem EGFR-Inhibitor Erlotinib steht mittlerweile auch ein Antikörper zur Verfügung, der eine zusätzliche Verbesserung des medianen Überlebens bewirkt (Moore et al., 2007). Doch auch nach Jahrzehnten intensiver Forschung steht immer noch keine konservative Therapieoption zur Verfügung, um dem PDAC kurativ zu begegnen oder zumindest Überlebenszeiten zu erreichen, die vergleichbar sind mit denen in anderen Tumorentitäten (Conroy et al., 2011; Jorgensen, 2001; Moore et al., 2007; Winter et al., 2006).

2.2 Der Hedgehog-Signalweg

Ein bedeutender Zuwachs an Kenntnis über das Pankreaskarzinom fand in den vergangenen Jahren vor Allem auf molekularer Ebene statt. So wurden sukzessive verschiedene bedeutende Gene wie *KRAS*, *STAT3* oder *TP53* identifiziert, die im Pankreaskarzinom mutmaßlich an der Karzinogenese beteiligt sind (Huang and Xie, 2012; Lauth, 2012). Eine viel beachtete Arbeit zum Pankreaskarzinom aus dem Jahr 2008 beschreibt außerdem 15 verschiedene Signalkaskaden, in denen ein oder mehrere Gene mutiert sind. Hierzu zählt auch der Hedgehog-Signalweg (Hh), der in 100% der Fälle mutiert ist (Jones et al., 2008). Weitere Tumorentitäten, bei deren Entstehung dem Hh-Signalweg eine Rolle eingeräumt wird, finden sich bei Tumoren der Haut, der Prostata, der Harnblasen, der Lunge, der Brust, des Hirns, des Kolons sowie des hämatologischen Systems, hierbei wäre beispielsweise die chronische lymphatische Leukämie zu nennen (Decker et al., 2012; Fan et al., 2004; Lin and Matsui, 2012; O'Toole et al., 2011).

Der Hh-Signalweg wurde an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt, wo seine Deaktivierung zum Auftreten morphologischer Abnormitäten führte: Larven, die an einem bestimmten Genlocus eine Mutation trugen, waren ungleichmäßig geformt und trugen stachelartige Ausstülpungen auf ihrer Oberfläche, die an das Aussehen eines Igels erinnerten. Diese Beobachtung stand Pate bei der Namensgebung des betreffenden Gens und später des gesamten Signalwegs (Nüsslein-Vollhard and

Wieschaus, 1980). Aufgrund dieser Beobachtung wurde in den folgenden Jahren die Beteiligung des Hh-Signalwegs an embryologischen Prozessen erforscht, allen voran seine Rolle bei der Differenzierung und Ausbildung der Körperlängsachse (Johnson et al., 1994). Seine besondere Stellung bei der Ausprägung morphologischer Merkmale verlangt ein gezieltes Einschalten der Signalfunktion, sobald diese benötigt wird. Tatsächlich scheint der Shh-Signalweg ähnlich einem Lichtschalter ein- und ausschaltbar zu sein, wodurch seine Aktivität gezielt einsetzbar ist (Lai et al., 2004; Wong et al., 2011). Neuere Untersuchungen bescheinigen ihm außerdem eine Rolle bei der Reparatur entzündeter oder beschädigter Gewebe. Kürzlich wurde seine Rolle als protektiver Faktor gegen Hypoxie (Ji et al., 2012a) sowie oxidativen Stress (Xia et al., 2012) belegt.

In Vertebraten existieren anstelle des Hedgehog-Gens drei verwandte Gene, die für die Hh-Liganden namens Sonic (SHH), Indian (IHH) und Desert Hedgehog (DHH) kodieren und der Hedgehog-Familie zugerechnet werden (Fietzl et al., 1994). Letztlich aktivieren alle drei Liganden im Vertebraten denselben Signalweg, weshalb man die ab dem Membranprotein PTCH1 „flussabwärts“ gerichtete, gemeinsame Endstrecke der durch SHH, IHH und DHH ausgelösten Effekte weiterhin als Hedgehog-Signalkaskade (Hh) bezeichnet. Vom Shh-Signalweg spricht man dann, wenn der beobachtete Effekt auf Aktivierung durch SHH-Liganden zurückzuführen ist oder explizit die Beteiligung von SHH gemeint ist. Im Vertebraten ist der Shh-Signalweg unter anderem maßgeblich an der Entwicklung des neuronalen Netzwerks beteiligt, in dem seine Bedeutung zum Beispiel an der Entwicklung der Neuralleiste bekannt ist (Dessaud et al., 2008). Die vorliegende Arbeit bezieht sich auf den Hh- und Shh-Signalweg, wie er in Vertebraten vorkommt. Dort nennt sich der Rezeptor für HH-Liganden PTCH1, während er in *Drosophila* lediglich PTCH heißt.

2.3 Aktivierung des Shh-Signalwegs und seine Effekte

2.3.1 Die Signalkaskade vom Liganden SHH zum Effektorprotein GLI1

Durch den Shh-Signalweg werden extrazelluläre Signale per membranständigem Rezeptorprotein aufgefangen und intrazellulär weitervermittelt, woraufhin Zielgene des Signalwegs aktiviert oder deaktiviert werden können. Der Ausgangspunkt hierfür

ist das Protein SHH, das von Zellen in den Extrazellulärraum sezerniert wird. Das Rezeptorprotein für SHH ist Patched (PTCH1), ein 12-helikales Membranprotein, das sich im inaktivierten Zustand auf einem speziellen zellulären Kompartiment namens „Primäres Zilium“ befindet und von dort den flussabwärts liegenden Shh-Aktivator Smoothed (SMO), ein 7-helikales Membranprotein, hemmt. Das Primäre Zilium ist eine Vorstülpung der Zelle, auf der die Bindung von SHH an PTCH stattfindet. Aufgrund noch nicht vollständig geklärter Mechanismen bewirkt die Bindung von SHH an PTCH, dass SMO in seine aktivierte Form übergeht und sich auf das primäre Zilium bewegen kann (Wang et al., 2009). Von dort aktiviert SMO eine intrazelluläre Signalkaskade, deren genauer Ablauf noch nicht bekannt ist. Sie beinhaltet jedoch die Aktivierung einer G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase (Meloni et al., 2006). Schlussendlich wird zytoplasmatisches GLI1 (kurz für glioma-associated oncogene 1) aktiviert, ein Zinkfinger-Protein, welches der potenteste Effektor der GLI-Familie ist (Ingham and McMahon, 2001).

2.3.2 Aktivierung von GLI1 und seinen Zielgenen

GLI1 befindet sich im inaktivierten Zustand in einem Proteinkomplex mit Suppressor of Fused (SUFU), wodurch es im Zytoplasma gebunden sowie sequestriert oder proteolysiert wird. Nach Aktivierung durch SMO löst sich GLI1 aus dem Proteinkomplex und bewegt sich in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl verschiedener Gene reguliert (Merchant et al., 2004).

Zum einen sind dies Gene, die für die Regulation wichtiger zellulärer Mechanismen verantwortlich sind: Beispielsweise steuert *MYCL1* die zelluläre Proliferation (Yoon et al., 2009); *PAX6* ist für Differenzierung, gerade auch in pankreatischem Gewebe, verantwortlich ; *BCL2* kodiert für ein anti-apoptotisches Protein und sorgt für verminderten programmierten Zelltod/Apoptose (Xu et al., 2009); und *CCDN2* und *CCNE1* kodieren für Cyclin D und Cyclin E, die für den G1/S-Übergang im Zellzyklus verantwortlich sind (Duman-Scheel et al., 2002). Darüber hinaus sind viele weitere Zielgene von GLI1 bekannt (Katoh and Katoh, 2009).

Zur GLI-Familie gehören weiterhin das Effektorprotein GLI2, das sowohl Aktivator als auch Repressor des Hh-Signalwegs ist, sowie GLI3, das vorrangig als Repressor agiert. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Expression von GLI1 untersucht.

Geringe Änderungen der Expression von *GLI1*-mRNA können drastische Änderungen der Hh-Signalaktivität zur Folge haben (Wong et al., 2011) und die *GLI1*-mRNA-Bestände korrelieren direkt mit der Aktivität des Hh-Signalwegs. Sie sind somit der am besten geeignete Parameter zu seiner qualitativen und quantitativen Beurteilung (Lauth, 2012).

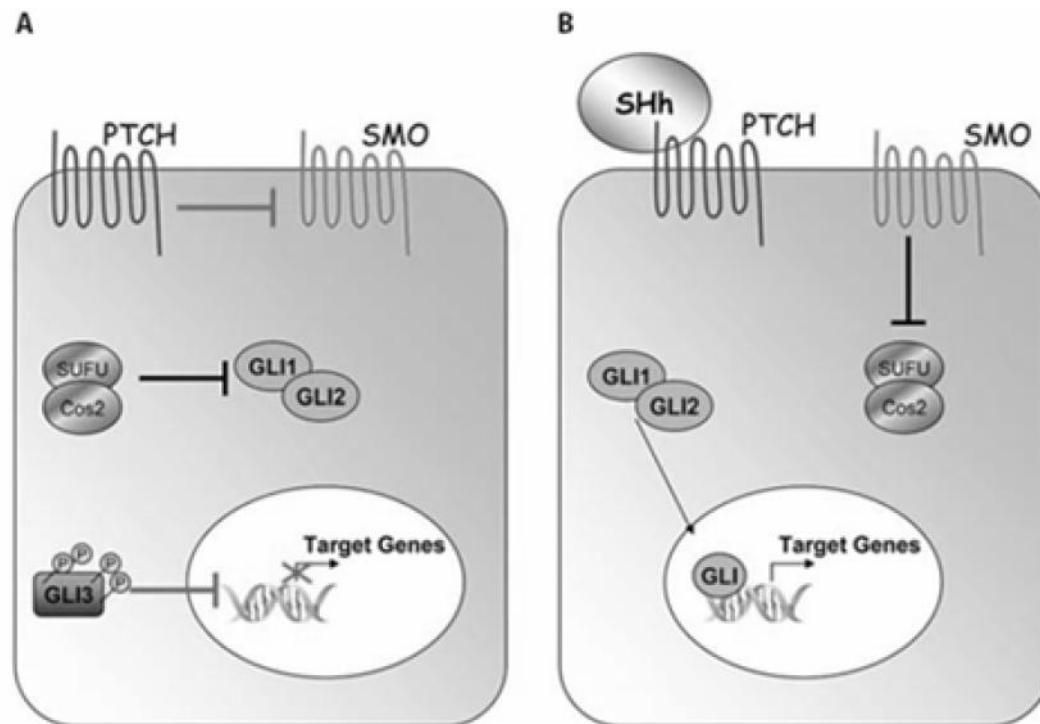


Abb. 1 Schematische Darstellung der Hedgehog-Signalkasade und ihrer Akteure vor (A) und nach (B) Aktivierung durch den Hh-Liganden; (Dosch et al., 2010)

2.3.3 Interaktionen mit anderen prominenten Signalwegen und Akteuren

Der Hh-Signalweg wird maßgeblich vom KRAS-Signalweg beeinflusst, der ebenfalls zu den „Kernsignalwegen“ des PDAC gehört und der generell zu einem der wichtigsten Signalwege der gesamten Tumorbilogie zu rechnen ist (Jones et al., 2008; Morris et al., 2010). Diese Beeinflussung ist ambivalent und hängt sowohl vom Aktivierungsgrad des Shh- als auch des KRAS-Signalweges ab. Zu welchem Zeitpunkt bei dem Wechselspiel der beiden Akteure ein positiver und wann ein negativer Rückkopplungsmechanismus eintritt, ist dabei nicht abschließend geklärt, doch vermutlich ist die frühe Aktivierung des Hh-Signalweges durch KRAS während der Tumorgenese entscheidend (Lauth, 2012; Mills et al., 2013). Schon seit längerem bekannt ist die enge Verzahnung von Shh- und Wnt- β -catenin-Signalweg (Morris et al.,

2010). Mit dem PI3K-Signalweg, dessen genaue Beteiligung am Hh-Signalweg noch unklar ist (Buonamici et al., 2010), und dem TGF- β -Signalweg, der aktivierenden Einfluss auf GLI1 ausübt (Nolan-Stevaux et al., 2009), nehmen zwei weitere prominente Akteure aus der Tumorbilogie direkten Einfluss auf die Aktivität des Hh-Signalwegs. Über die Aktivierung von IL-6 vermittelt GLI1 auch eine erhöhte Aktivität von STAT3, einem für die Tumorgenese bedeutsamen Akteur (Mills et al., 2013). Dies sind nur einige Beispiele aus einem weiten und mit Sicherheit unzureichend erforschten Feld. Aufgrund der großen Komplexität der zahlreichen zellulären Interaktionen kann dieses Thema also allenfalls oberflächlich aufgegriffen werden.

2.3.4 Selbstregulation des Shh-Signalweges

Zielgene von GLI1 sind auch die Gene des Hh-Signalweges selbst: GLI1 steuert die Expression der Liganden SHH, DHH und IHH. Insbesondere durch die Sekretion von SHH kann im Pankreaskarzinom so ein autostimulatorischer Effekt entstehen, der auch „autokrine Stimulation Typ 2“ genannt wird. Bei dieser Form der Selbstaktivierung dienen Tumorzellen, die vermehrt Hh-Liganden produzieren, diesen Liganden gleichzeitig als Zielzelle. Somit ist ein ausuferndes Zellwachstum möglich (Lin and Matsui, 2012). Weiterhin wird die Expression von GLI1, des Effektorproteins des Hh-Signalwegs, über dessen eigene Aktivität gesteuert. Eine Stimulation erhöht die Transkription von GLI1, sodass hohe Levels von *GLI1*-mRNA mit einem hohen Aktivierungsgrad des Signalwegs korrelieren, während bei geringer Aktivierung auch die Expression von *GLI1* reduziert ist (Lauth, 2012).

PTCH1 ist ein potentes Tumorsuppressorgen des Hh-Signalweges und ist ebenfalls ein Zielgen von GLI1. Die Funktion von PTCH wurde an *Drosophila* erstmalig beschrieben, wo eine Deaktivierung des Gens *PTCH* eine starke Überexpression von Zielgenen des Hh-Signalweges zur Folge hatte (Fietzl et al., 1994). Aktivierung von GLI1 induziert die Expression von PTCH und stellt somit einen Mechanismus negativer Rückkopplung innerhalb des Signalwegs dar (Yoon et al., 2009).

2.4 Der Shh-Signalweg und Tumorgenese

2.4.1 Rolle des Tumorsuppressorgens *PTCH1* und des Protoonkogens *SMO*

Der Shh-Signalweg fungiert auf verschiedenen Ebenen als treibendes Element von Tumorerkrankungen. Aufgrund des Aufbaus des Signalweges kann dies auf verschiedene Arten erfolgen. Zum einen gibt es die beiden membranständigen Akteure *PTCH1* und *SMO*. *PTCH1* fungiert als Tumorsuppressorgen, und Verluste der Heterozygotie (engl. *loss of heterozygosity*, LOH) in diesem Gen können zum Verlust seiner Tumorsuppressorfunktion führen. Dies ist im sporadischen Basalzellkarzinom (BCC) und Basalzellnävussyndrom (Gorlin-Syndrom) der Fall, bei denen es zu einer Mutation auf dem Allel des *PTCH1*-Gens kommt (Gailani et al., 1996). Man geht davon aus, dass zur Tumorgenese beide Allele Mutationen tragen müssen. Demnach ist ein LOH bei vorbestehender Fehlfunktion auf dem ersten Allel Voraussetzung für den Funktionsverlust von *PTCH1* und somit entscheidend für die Pathogenese (Aszterbaum et al., 1998). So kommt es zum sporadischen Auftreten der Krankheit. Schätzungsweise 90% der sporadischen BCCs tragen eine Mutation in mindestens einem der beiden Allele von *PTCH1*, während die übrigen 10% Mutationen von *SMO* beherbergen (Epstein, 2008). Beteiligt sind diese Mutationen auch an der Entstehung des Medulloblastoms. Dort gibt es ebenfalls Mutationen im *PTCH1*-Gen, die auf dieselbe Weise wie im sporadischen BCC wirken (Thompson et al., 2006)

Aktivierende Punktmutationen (Gain-of-function, GOF) sind eine weitere Möglichkeit für den Hh-Signalweg, an der Entstehung einer Tumorerkrankung beteiligt zu sein. Sie wurden im Falle des Shh-Signalweges ebenfalls zum ersten Mal im sporadischen BCC identifiziert (Xie et al., 1998). Anhand des klinischen Fallberichts einer plötzlich aufgetretenen Resistenz gegen *SMO*-Inhibitoren bei einem Patienten mit Medulloblastom wird dabei deutlich, wie sehr eine Punktmutation das Ausmaß einer Tumorerkrankung bestimmen kann (Charles M. Rudin et al., 2009). Deshalb ist *SMO* per definitionem als Protoonkogen zu bezeichnen. Zwar ist die ligandenunabhängige Induktion im Medulloblastom vorherrschend (Romer et al., 2004), doch es zeigt sich hier das pathogenetische Bild insgesamt heterogener. Man misst Mutationen im Shh-Signalweg einen Anteil von maximal 30% der Fälle zu, von denen nur circa die Hälfte davon auf Mutationen in *PTCH1* oder *SMO* zurückzuführen sind. Weitere Akteure des

Shh-Signalweges können Mutationen aufweisen und zur Tumorentstehung beitragen (Ng and Curran, 2011).

2.4.2 Ligandenabhängige Aktivierung des Shh-Signalweges bei Tumorerkrankungen

Viele Tumorentitäten werden hingegen nicht durch Mutationen in *PTCH1* oder *SMO* ausgelöst, sondern durch eine erhöhte Expression von HH-Liganden, die vor allem das umliegende Tumorstroma stimulieren (Yauch et al., 2008). Darunter befinden sich Tumoren des Hirns (Clement et al., 2007), hämatologische Tumoren (Decker et al., 2012), nichtkleinzellige (Yuan et al., 2007) und eine Untermenge kleinzellige Lungentumoren (Watkins et al., 2003), Tumoren von Prostata (Fan et al., 2004), Brust oder Ovar (O'Toole et al., 2011) sowie des Verdauungstraktes einschließlich des Pankreas (Berman et al., 2003). Der Mechanismus der ligandenabhängigen Aktivierung wird in Abbildung 2 und in Kapitel 2.5 genauer erläutert.

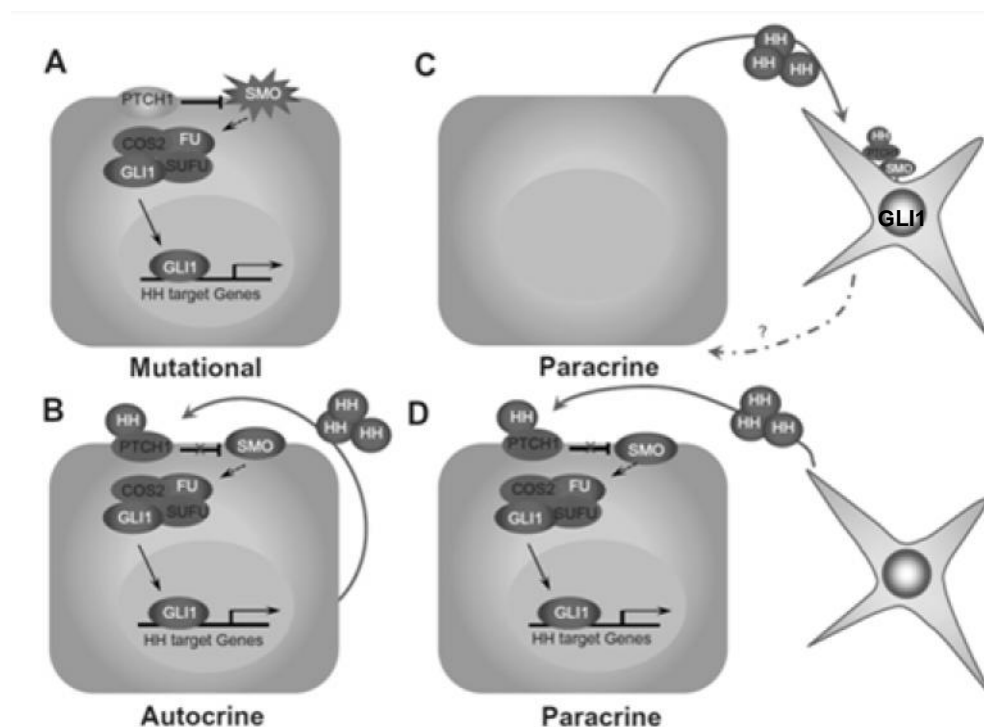


Abb. 2 Wege der Hh-Aktivierung. **A** Typ-I-Aktivierung (ligandenunabhängige Aktivierung) des Hh-Signalwegs durch Mutationen der Tumorzelle, beispielsweise im *SMO*-Gen **B** Typ-II-Aktivierung (autokrine Aktivierung) durch Stimulation der Tumorzellen mittels eigens sezernierter Hh-Liganden, **C** Typ-IIIa-Aktivierung (paracrine Aktivierung) des Tumorstromas durch von Tumorzellen sezernierte Hh-Liganden, **D** Typ-IIIb-Aktivierung von Tumorzellen durch parakrin sezernierte Hh-Liganden aus Tumorstroma; (Lin and Matsui, 2012)

2.5 Der Shh-Signalweg und das PDAC

2.5.1 Genese des PDAC und Assoziation mit der Reaktivierung des Shh-Signalweges

Im gesunden pankreatischen Gewebe sind die Gene des Shh nicht exprimiert, der Signalweg „ruht“. Dies ändert sich auf dem Boden einer chronischen Pankreatitis: Es wird in endständigen Drüsen der Pankreasgänge (engl. Pancreatic duct glands, PDG) vermehrt SHH exprimiert. Als mögliche Ursache hierfür wird diskutiert, dass die Reaktivierung des Shh-Signalwegs zur Reparatur beschädigten Gewebes dient, das unter der chronischen Entzündung leidet. Entscheidend für die Tumorgenese ist wahrscheinlich der Zeitpunkt der Aktivierung, der im Kontext weiterer genetischer Mutationen auftritt (Fendrich et al., 2008; Lauth and Toftgard, 2011). Die chronische Pankreatitis ist hierbei mit dem Auftreten von PanIN's, charakteristischen Vorläuferläsionen des PDAC, assoziiert (Strobel et al., 2010). Der Einfluss des Zeitpunktes der Signalweg-Reaktivierung konnte bei knockout-Mäusen gezeigt werden: In Shh-knockout PKCY Mäusen (*Pdx1-Cre;Kras^{LSL-G12D/+};p53^{fl/+}; Rosa26^{LSL-YFP/+}*), die von Geburt an überhaupt kein Shh produzieren, wuchsen die Shh-defizienten Tumore schneller und aggressiver und wiesen einen niedrigeren Differenzierungsgrad auf (Rhim et al., 2014). Während der Shh-Signalweg im ausgereiften PDAC erheblich zum Malignitätspotential beisteuert, wirkt er auf dessen Vorstufen wahrscheinlich als protektiver Schutzmechanismus.

PanIN steht für *pankreatische intraepitheliale Neoplasie* und beschreibt eine Atypie von pankreatischen Zellen und Gewebe, die vom gesunden Pankreas histologisch abweicht und aufsteigend von mäßig bis hin zu stark dedifferenziertem Gewebe in die vier Subklassen PanIN 1A, 1B, 2 und 3 eingeteilt wird. Mit dem Eintreten dieser charakteristischen Vorläuferläsion geht eine Reaktivierung des Shh-Signalwegs einher, was anhand der Reexpression von SHH und PTCH in resezierten pankreatischen Gewebeproben gezeigt wurde (Thayer et al., 2003). Diese Reaktivierung manifestiert sich, wenn auf dem Boden einer Vorläuferläsion ein Karzinom entsteht: Im Pankreaskarzinom sind SHH und PTCH stark exprimiert und für das Wachstum der Tumorzellen wird die Überexpression von SHH benötigt (Berman et al., 2003). In GLI1-knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass der Malignitätsgrad, das Tumolvolumen sowie die Prognose stark abhängig vom Hh-Signalweg sind (Mills et al.,

2013). Je nach Grad der Dedifferenzierung erhöht sich die Expression von wichtigen Shh-Akteuren wie *SHH* und *GLI1* (Quint et al., 2009). Eine erhöhte Expression von *GLI1* im PDAC ist assoziiert mit einer erhöhten Malignität und einer schlechteren Prognose (Yang et al., 2013). Im PDAC sind die Gene des Shh-Signalwegs ständig exprimiert und seine dauerhafte Aktivität ist im PDAC bewiesen. Mutationen des Shh-Signalwegs sind im PDAC in vermutlich 100% der Fälle anzutreffen (Jones et al., 2008).

2.5.2 Tumorstroma, Desmoplasie

Besondere Erwähnung verdient hier das Tumorstroma, ein bindegewebiges Kompartiment in der Mikroumgebung der Tumorzellen, das größtenteils aus Myofibroblasten und kollagener Extrazellulärmatrix besteht, und welches das Tumorgewebe von außen abschirmt. Dieser Vorgang wird auch als Desmoplasie bezeichnet. Dem Stroma wird eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung von Chemoresistenz und Invasivität eingeräumt, weswegen es ein kritischer Faktor bei jeder medikamentösen Therapie des PDAC sein wird (Chu et al., 2007; Hidalgo and Maitra, 2009). Während die Expression von *SHH* in Tumorzellen sehr hoch ist, weisen die Tumorstromazellen, gemessen an *GLI1* mRNA-Levels, eine außergewöhnlich hohe Gesamtaktivität des Shh-Signalwegs auf (Lauth et al., 2010). Es wurde daraufhin eine ligandenabhängige Interaktion zwischen Tumorzellen und Stroma postuliert, die sich „parakrine Stimulation“ nennt: Hierbei bilden Tumorzellen vermehrt *SHH*-Liganden (Tian et al., 2009) sowie andere Mediatoren (Mills et al., 2013), wodurch sie das Wachstum des umliegenden Stromas stimulieren und sich vom körpereigenen Metabolismus abschirmen. Gewissermaßen baut sich der Tumor so seine eigene „Festung“. Die Zusammensetzung des Stromas ist vielfältig und komplex (s.Abb. 3) (Lunardi et al., 2014). Sein Beitrag zur hohen Malignität des PDAC wird mittlerweile jedoch wieder kontroverser diskutiert: So schreibt man dem Stroma durch seine isolierende Wirkung auf den Tumor selbst auch einen protektiven Effekt vor Dedifferenzierung, Tumorvaskularisation, Invasivität und Metastasierung zu (Rhim et al., 2014).

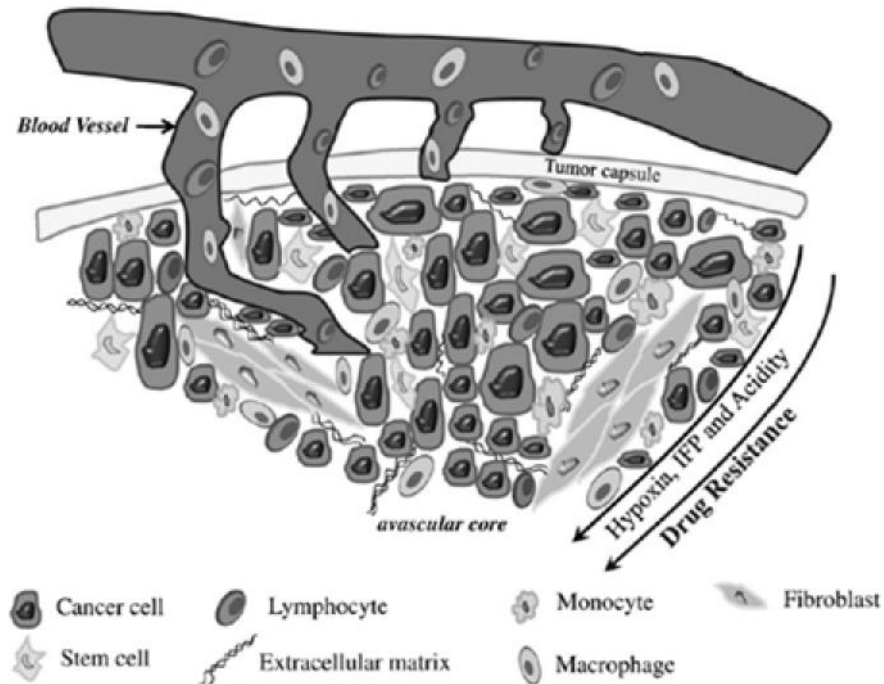


Abb. 3 Tumorstroma. Schematische Darstellung der Mikroumgebung eines soliden Tumors, wie sie auch im PDAC beobachtet wird. Das Tumorstroma setzt sich unter anderem aus Fibroblasten zusammen, die durch den Aufbau von Extrazellulärmatrix die Vaskularisierung des Tumors erschweren und somit Chemoresistenz vermitteln. Desweiteren sind Immunzellen und viele andere Zelltypen am Aufbau der Mikroumgebung eines Tumors beteiligt; (Danquah et al., 2011)

2.5.3 Krebsstammzellen

Ein weiterer wichtiger Schauplatz der Pathophysiologie des PDAC wird durch die sogenannten Krebsstammzellen eingenommen (engl. Cancer stem cells, CSC). Zuerst wurde für hämatologische Tumorerkrankungen (Bonnet and Dick, 1997) und später für Tumoren des Hirns (Singh et al., 2004) sowie weitere Tumorentitäten gezeigt, dass ihre Proliferation und Expansion durch sich selbst erneuernde Zellen getrieben wird. Diesen werden Eigenschaften von Stammzellen zugeschrieben: Dazu zählt unter anderem die Fähigkeit, die eigene Stammzellpopulation zu erhalten und differenzierte Nachkommen zu bilden. Die Existenz solcher CSC wurde auch für das PDAC postuliert und einige Jahre später bewiesen (Li et al., 2007). Anhand bestimmter Oberflächenmoleküle wurden Zellen bestimmt, die mit den Fähigkeiten zur Selbsterneuerung, zur Tumorentstehung und zur Bildung von tumorösen Nachkommen die charakteristischen Eigenschaften von CSC innehaben. Interessanterweise ist in den pankreatischen CSC der Shh-Signalweg stark aktiviert und gerade gegenüber „normalen“ Tumorzellen seine Aktivität drastisch erhöht (Li et al., 2007). Die Tatsache,

dass der Shh-Signalweg als essentiell für die Aufrechterhaltung der Aktivität von CSC betrachtet wird, verleiht diesem Signalweg bei der Erforschung neuer medikamentöser Therapien des PDAC eine noch größere Bedeutung (Lee et al., 2008). In der Tat gelang es bereits, durch Einsatz eines SMO-Inhibitors die Proliferation pankreatischer CSC zu inhibieren (Singh et al., 2011).

2.5.4 Epithelial-mesenchymale Transition

Epithelzellverbände exprimieren Adhäsionsproteinen wie E-Cadherin oder Zytokeratine, organisieren somit den interzellulären Zusammenhalt und besitzen dadurch eine geringe Migrationsfähigkeit. Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist ein Vorgang, bei dem Epithelzellen durch den Verlust von Adhäsionsproteinen ihren epithelialen Charakter verlieren und die Basalmembran passieren können. Diese erhöhte Zellmotilität hat bei embryologischen Vorgängen wie der Gastrulation große Bedeutung, da sie die Ausdifferenzierung verschiedener Organe und Gewebe steuert (Kalluri and Weinberg, 2009; Peinado et al., 2004). Die EMT ist aber auch ein Merkmal von invasiv wachsenden Tumoren, verleiht diesen ein erhöhtes Metastasierungspotential und ist gekennzeichnet durch den Verlust der Zellpolarität (Thiery et al., 2009). Für das PDAC, das sich gerade durch frühzeitige und aggressive Metastasierung hervorhebt, gilt eine Teilhabe der EMT als sicher. Eine Beteiligung des Shh-Signalweges an der EMT ist bekannt (Krantz et al., 2012). Über seinen Effektor GLI1 treibt er in pankreatischen Tumorzellen die EMT an (Joost et al., 2012).

2.5.5 Chemoresistenz

Im klinischen Alltag hat sich die Resistenz des PDAC gegen Chemotherapeutika im Allgemeinen und gegen Gemcitabin im Besonderen als großes Problem erwiesen. Die sogenannte Chemoresistenz wird durch verschiedene Faktoren verursacht, von denen dem Tumorstroma derzeit die bedeutendste Rolle zugerechnet wird. Bei entsprechend starker Ausprägung des Stromas ist es schlichtweg unmöglich, adäquate Konzentrationen an Gemcitabin im inneren eines Tumors zu erreichen (Hidalgo and Maitra, 2009). Auch CSC weisen eine erhöhte Chemoresistenz auf, was ihnen die Fähigkeit verleiht, eine chemotherapeutische Behandlung zu überleben und die Tumorzellpopulation zu erneuern (Shah et al., 2007). Doch auch in den Tumorzellen

selbst sind intrinsische Mechanismen beschrieben, die diesen Zellen Immunität gegenüber therapeutischen Konzentrationen von Gemcitabin verleihen. Transportproteine vom Typ ATP-binding cassette (ABC), die in der Zellmembran lokalisiert sind und Chemotherapeutika aktiv aus der Zelle heraus transportieren können, sind in Gemcitabin-resistenten Tumorzellen beschrieben vermehrt exprimiert und funktional mit der Erlangung von Chemoresistenz verknüpft (Du et al., 2011; Hong et al., 2009). Durch die Expression verschiedener Transportproteine übt der Hh-Signalweg auch direkt eine Chemoresistenz induzierende Wirkung im PDAC aus (Xu et al., 2013). Es wurde in den etablierten Zelllinien Capan-1 und Panc-1 außerdem gezeigt, dass sich nach Behandlung mit Gemcitabin in gesunden Zellen die Expression des SHH-Liganden steigert. Wie genau dieser Mechanismus mit der erhöhten Toleranz gegenüber Chemotherapeutika zusammenhängt, ist nicht genau geklärt, doch es wird vermutet, dass die zelluläre Proliferation durch den Shh-Signalweg zusätzlich angetrieben wird. Außerdem wurde das Erlangen von Chemoresistenz mit der vermehrten Expression von EMT-Markern verbunden (Quint et al., 2012).

2.6 Inhibitoren des Hh-Signalweges

2.6.1 Cyclopamin und niedermolekulare SMO-Antagonisten

Eine Beteiligung des Hh-Signalwegs ist auf den wichtigen Ebenen des PDAC in Tumorzellen, im Tumorstroma sowie in den CSC nachgewiesen. In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von Substanzen entdeckt oder entwickelt, die den Hh-Signalweg an verschiedenen Stellen inhibieren. Den Anfang dieser Entwicklung markierten die SMO-Inhibitoren mit dem natürlichen Alkaloid *Cyclopamin*, das aus *Veratrum californicum* gewonnen wird. Nach Applikation der Substanz war das Wachstum von Fibroblasten beeinträchtigt, in denen entweder das Gen *PTCH* deaktiviert oder aktiviert war, während Zellen mit einer Mutation im *SMO*-Gen kein verändertes Wachstumsverhalten nach Cyclopamin-Behandlung zeigten. Es wurde schlussendlich gezeigt, dass Cyclopamin direkt auf SMO wirkt und das Zellwachstum somit durch Beeinträchtigung des Hh-Signalwegs hemmt (Taipale et al., 2000). Mit GDC-0449 (Vismodegib) und IPI-926 (Saridegib) wurden zwei weitere SMO-Inhibitoren gefunden, die sich gegenüber Cyclopamin durch verbesserte Wasserlöslichkeit und

erhöhte Affinität zum SMO-Protein auszeichneten (Rominger et al., 2010), (Tremblay et al., 2009). LDE225 ist einer der jüngsten Vertreter in der Generation der niedermolekularen SMO-Inhibitoren und zeichnet sich durch eine hohe orale Bioverfügbarkeit von 69 % bis zu 102 % sowie eine besonders hohe Affinität zu SMO aus. Seine halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) für SMO, also die Konzentration, bei der die Hälfte aller SMO-Moleküle gehemmt sind, lag in einem Genreporter-Assay im nanomolaren Bereich (Pan et al., 2010). Aufgrund dieser Eigenschaften ist zu erwarten, dass LDE225 als Substanz zur SMO-Antagonisierung *in vivo* besonders gut geeignet ist.

Problematisch ist hierbei, dass Tumoren schnell Resistenzen gegen SMO-Inhibitoren entwickeln können. In einem Mausmodell wurde gezeigt, dass die alleinige Applikation von MS-0022, einem weiteren niedermolekularen SMO-Inhibitor, das Wachstum von PDAC's nur vorübergehend aufhalten konnte (Strand et al., 2011). Es existiert bereits ein klinischer Fallbericht über einen Patienten mit Medulloblastom, bei dem nach Behandlung mit GDC-0449 eine schnell eintretende Resistenz gegenüber SMO-Inhibitoren aufgrund einer Punktmutation im *SMO*-Gen festgestellt wurde (Charles M. Rudin et al., 2009).

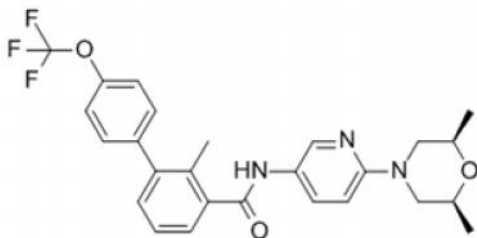


Abb. 4 Strukturformel von NVP-LDE225 (Quelle: http://www.chemscene.com/product_pic/LDE225.gif, 2013)

2.6.2 Weitere Inhibitoren des Hh-Signalweges

Die SMO-Antagonisten stellen die größte und am besten erforschte Substanzgruppe innerhalb der Hh-Inhibitoren dar, doch es ist möglich, den Hh-Signalweg durch niedermolekulare GLI1-Inhibitoren gezielt zu hemmen. GANT58 und GANT61 haben *in vitro* die Proliferation von Prostata-Tumorzellen effektiv verhindert, und *in vivo* das Wachstum von soliden Prostatatumoren in einem Mausmodell verzögert bzw. verhindert (Lauth et al., 2007). Bei *in vivo*-Versuchen mit dem niedermolekularen GLI1-Inhibitor NanoHHI konnte das Wachstum von Pankreastumoren deutlich reduziert

werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass der Wirkstoff das Wachstum von xenotransplantierten Medulloblastomen ebenfalls in hohem Maße aufhalten konnte. Dies war auch dann der Fall, wenn die Tumoren eine *SMO*-Mutation trugen, die ihnen eine Resistenz gegenüber *SMO*-Antagonisten verlieh (Chenna et al., 2012). Interessant sind diese Daten vor allem deshalb, weil mit *GLI1*-Inhibitoren der endständig gelegene Akteur des Hh inhibiert wird, wodurch im Signalweg flussaufwärts gelegene Mutation umgangen werden können. Dies könnte man sich sowohl in der Therapie als auch der Erforschung von *SMO*-mutierten Tumoren zunutze machen.

2.7 SMO-Antagonisten im PDAC

Durch eine Vielzahl an *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten ist in den letzten Jahren der Kenntnisstand über die Wirkung von *SMO*-Antagonisten sowohl auf Tumorprogress und Überleben als auch auf die verschiedenen Tumorkompartimente wie Stroma oder CSC gewachsen. Mit Cyclopamin konnte in einem Mausmodell die Tumorgroße verringert und das Überleben verlängert werden (Feldmann et al., 2008b). Vismodegib (GDC-0049), dessen antiproliferative Wirkung in mehreren Zelllinien gezeigt wurde, steht exemplarisch für die Wirkung von *SMO*-Antagonisten auf Tumorzellen und CSC (Singh et al., 2011). Auch mit Saridegib (IPI-926) wurde in einem Mausmodell das Tumorwachstum verhindert (Strand et al., 2011) und sogar der Transport von Gemcitabin in das Tumorgewebe deutlich verbessert, was den besonderen inhibitorischen Einfluss von *SMO*-Antagonisten auf das Tumorstroma darlegt (Olive et al., 2009). Diese Veränderungen waren jedoch vorübergehender Natur, was auf eine rasche Resistenzentwicklung der Tumoren gegenüber *SMO*-Inhibition schließen lässt. Möglicherweise hängt dies auch mit dem Abbau der Stromabarriere durch *SMO*-Inhibitoren sowie der konsekutiv gesteigerten Malignität des PDAC zusammen: In einer neu erschienenen Arbeit zeigten Mäuse mit PDAC nach Behandlung mit IPI-926 eine reduzierte Überlebenszeit gegenüber der Vergleichsgruppe (Rhim et al., 2014).

In Inselzelltumoren des Pankreas wurde schließlich auch für LDE225 gezeigt, dass es das Tumorwachstum verhindert und das Überleben verlängert (Fendrich et al., 2011). Aufgrund der wichtigen Rolle des Hedgehog Signalwegs in der Entstehung und Progression von Tumoren, insbesondere des PDAC, stellt sich die Frage, ob eine Inhibition dieses Signalwegs in den Tumorzellen selbst einen therapeutischen Nutzen

haben kann. Für LDE225 gibt es in Tumorzellen des PDAC noch keine Untersuchungen. Um der oben genannten Frage weiter nachzugehen, wurde in der vorliegenden Arbeit dieser SMO-Inhibitor auf seine antiproliferative Wirkung in zwei Gemcitabin-sensitiven („wildtyp“) und Gemcitabin-resistenten („GR“) Zelllinien untersucht.

3. Fragestellung

In den vergangenen Jahren ist die Rolle des Hedgehog (Hh)-Signalwegs gerade beim Pankreaskarzinom besser untersucht und verstanden worden. Man geht mittlerweile davon aus, dass Fehlregulationen des Hh-Signalwegs eine zentrale Position bei der Genese und Aufrechterhaltung der Krankheit haben. Er vermittelt auf verschiedenen Ebenen die Entstehung von Chemoresistenz und könnte daher eine Schlüsselposition bei der Chemotherapie von Tumoren haben. Es gibt vielversprechende Ansätze, wie mit modernen Hh-Inhibitoren vorübergehend das Wachstum von Tumoren gehemmt werden und die Wirkung von Chemotherapeutika erhöht werden kann. Indes konnten bisher weder der Erkenntniszuwachs auf diesem Gebiet noch die Entdeckung neuer Substanzen, die auf den Hh-Signalweg wirken, in klinische Fortschritte bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms umgemünzt werden.

Bislang konzentrierten sich die meisten Veröffentlichungen zum Thema Hh-Inhibition beim Pankreaskarzinom auf die Wirkung auf das Tumorstroma oder Tumorstammzellen. Die Tumorzellen hingegen, denen im Rahmen der Hh-Deregulation vor allem die Rekrutierung von neuem Tumorstroma durch parakrine Stimulation zugeschrieben wird, waren bei der Anwendung von Smoothened-Inhibitoren bislang eher selten im Fokus des Interesses. Doch auch sie scheinen auf Deregulationen im Shh-Signalweg angewiesen zu sein, die sie als Ziel einer pharmakologischen Therapie interessant machen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Wirkung des Smoothened-Inhibitors LDE225 auf die eigentlichen Tumorzellen des Pankreaskarzinoms *in vitro* zu beschreiben. Hierfür wurden zwei etablierte, Gemcitabin-sensitive PDAC-Zelllinien epithelialen Ursprungs, Capan-1 und Panc-1, untersucht (wildtyp-Zellen, wt-Zellen). Außerdem wird ein Zusammenhang zwischen dem Shh-Signalweg und der Ausbildung von Chemoresistenz vermutet. Anhand Gemcitabin-resistenter (GR) Stämme dieser Zelllinien sowie der wt-Zellen sollte deshalb untersucht und beschrieben werden, welchen Einfluss – insbesondere unter dem Aspekt der Gemcitabinresistenz – die Hemmung des Hh-Signalweges durch LDE225 auf Wachstum, Proliferation, Zellzyklus und Genexpression von Zellen des PDAC *in vitro* hat.

4. Material und Methoden

4.1 Material

Tab. 1 Geräte

Gerät	Hersteller
Eismaschine	Manitowoc GmbH, Herborn (Deutschland)
Elektrophorese-Materialset <i>Mini-PROTEAN®</i>	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien (USA)
ELISA-Reader <i>Molecular Devices Emax Precision Microplate Reader</i>	McKinley Scientific, Sparta, New Jersey (USA)
FACS <i>Attune™ Acoustic Focusing Cytometer</i>	Life Technologies Corp., Carlsbad, Kalifornien (USA)
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr-International AG, Biberach a.d. Riss, (Deutschland)
Gefrierschrank (-20 °C)	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen (Deutschland)
Gefrierschrank (-80 °C)	SANYO Electric Co., Ltd., Moriguchi, Präfektur Ōsaka (Japan)
Kühlschrank <i>LIEBHERR Comfort</i>	Liebherr-International AG, Biberach an der Riss, (Deutschland)
Inkubator	Heraeus Instruments, Osterode (Deutschland)
Lichtmikroskop <i>Olympus CK2</i>	Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo (Japan)
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)
PCR-Cycler <i>CFX 96 RT PCR Detection System</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien (USA)
Pipette Multichannel <i>Finnpipette Novus(Multichannel)</i>	Thermo Electron Corporation, Langenselbold (Deutschland)

Pipette <i>Pipetboy accu-jet</i> ®	Brand GmbH + CO KG, Wertheim (Deutschland)
Pipetten <i>Discovery Comfort</i> (2; 10; 20; 100; 200; 1000 µl)	Abimed Hit Lab Solutions, Warschau (Polen)
Röntgenfilm <i>Fuji Medical RX</i>	FUJIFILM, Düsseldorf (Deutschland)
Röntgenplatte <i>SRX-101A</i>	KONICA MINOLTA, Marunouchi, Präfektur Tokyo (Japan)
Sterilbank <i>Bio-II-A</i>	Telstar, Frankfurt (Deutschland)
Sterilbank <i>KR 125</i>	Kojair Tech Oy, Vilppula (Finnland)
Tank Blot <i>Mini Trans-Blot</i> ® System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien (USA)
Thermocycler <i>PTC-200 Peltier Thermal Cycler</i>	MJ Research Inc., St. Bruno (Kanada)
Vortex <i>VORTEXGENIE2</i>	Scientific Industries Inc., New York (USA)
Wasserbad <i>TW 20</i>	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach (Deutschland)
xCELLigence <i>RTCA SP Station + Analyzer</i>	Roche Applied Science, Mannheim (Deutschland)
Zentrifuge <i>5430 R</i>	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Zentrifuge <i>GS-15R Centrifuge</i>	Beckman Corp., Pasadena, Kalifornien (USA)
Zentrifuge <i>Minifuge CL</i>	Heraeus-Christ GmbH, Osterode (Deutschland)
Zentrifuge <i>Sprout</i> ™	Heathrow Scientific® LLC, Illinois (USA)

Tab. 2 Kits

Kit	Inhalt	Hersteller
BCA-Assay <i>Pierce® BCA Protein Assay Kit</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Reagent A (Pufferlösung) • Reagent B (Kupfersulfatlösung) 	Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts (USA)
Block-Protein-Lösung <i>ECL Advance Blocking Reagent</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ECL 500 Blocking agent 	GE Healthcare, Little Chalfont (Vereinigtes Königreich)
cDNA-Synthese <i>iScript™ cDNA Synthesis Kit</i>	<ul style="list-style-type: none"> • iScript reaction mix • iScript reverse transcriptase • Nuklease freies H₂O 	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Chemilumineszenz <i>ECL Advance Western Blotting Detection Kit</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ECL 500 Solution A ("Proprietary Luminol") • ECL 500 Solution B (Peroxidlösung) 	GE Healthcare, Little Chalfont (Vereinigtes Königreich)
PCR-Kit <i>SsoFast™ EvaGreen® Supermix</i>	<ul style="list-style-type: none"> • SsoFast™ EvaGreen® Supermix 	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California (USA)
RNA-Extraktion <i>RNeasy Mini Kit</i>	<ul style="list-style-type: none"> • RNeasy Mini spin columns • Sammelröhrchen • RLT-Puffer • RW1-Puffer • RPE-Puffer • RNase-freies H₂O 	QIAGEN GmbH, Hilden (Deutschland)

Tab. 3 Software

Software	Hersteller
<i>Attune™ Cytometric Software v1.2</i>	Life Technologies Corp., Carlsbad, Kalifornien (USA)
<i>Bio-1D Version v15.01</i>	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell (Deutschland)
<i>Bio-Rad CFX-Manager v2.0</i>	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien (USA)
<i>FlowJo v7.6.5</i>	Tree Star Inc., Ashland, Oregon (USA)
<i>Microsoft Excel 2007</i>	Microsoft Corp., Redmond, Washington (USA)
<i>RTCA v1.2.1</i>	ACEA Biosciences Inc., San Diego, Kalifornien (USA)
<i>SOFTmax Pro 3.1.1</i>	Molecular Devices Inc., Sunnyvale, Kalifornien (USA)

Tab. 4 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturbedarf

<i>Attune Focusing Fluid</i>	Life Technologies Corp., Carlsbad, Kalifornien (USA)
<i>Attune Performance Tracking Beads</i>	Life Technologies Corp., Carlsbad, Kalifornien (USA)
<i>Attune Shut Down Solution</i>	Life Technologies Corp., Carlsbad, Kalifornien (USA)
<i>Attune Wash Solution</i>	Life Technologies Corp., Carlsbad, Kalifornien (USA)

DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (Deutschland)
Gemcitabin	GRY-Pharma GmbH, Kirchzarten (Deutschland)
LDE225 (Handelsname NVP-LDE225)	Novartis AG, Basel (Schweiz)
PreStained Marker Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard	Invitrogen AG, Karlsruhe (Deutschland)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (Deutschland)
PVDF-Nitrozellulosemembran	Millipore, Billerica, Massachusetts (USA)
Immobilon®-P	
FBS	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
Gentamycin	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
PBS	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
Trypsin	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)

Tab. 5 Kulturmedien

Medium	Zusätzlich versetzt mit	Hersteller
DMEM	<ul style="list-style-type: none"> 10 % (V/V) FBS 	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
(Dubelco's Modified Eagle Medium)	<ul style="list-style-type: none"> 1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin 0,5 % (V/V) Gentamycin 	

RPMI 1640	<ul style="list-style-type: none"> • 10 % (V/V) FBS • 1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin • 0,5 % (V/V) Gentamycin 	Biochrom AG, Berlin (Deutschland)
Einfriermedium	• 44% (V/V) FBS	Biochrom AG, Berlin
R10 (RPMI 1640)	• 7,3% (V/V) DMSO	(Deutschland)
D10 (DMEM)		

Tab. 6 Puffer und Lösungen

Typ	Zusammensetzung	
Blot Puffer 10x	130,3 g	Tris-HCl
(100 ml 10x-Puffer werden gelöst in 700 ml aq. Dest. U. 300 ml Methanol)	144 g 1,85 ml	Glycin SDS (20%)
Jie's Buffer	10 mM	NaCl
	0,5% (V/V)	NP-40
	20 mM	Tris-HCl pH 7,4
	5 mM	MgCl ₂
	1 mM	PMSF
	Nach Herstellerangaben	Proteaseinhibitor
Laemmli-Puffer 1x	0,1 %	2-Mercaptoethanol
	0,0005 %	Bromophenol blau
	10 %	Glycerol
	2 %	SDS 2%

	63 mM	Tris-HCl pH 6,8
PI-Lösung	50 µg/ml	Propidiumiodid
(gelöst in PBS)	0,1 %	Na-Citrat
	0,1 %	Triton X-100
SDS Running Buffer	130,3 g	Tris-HCl
	144 g	Glycin
	50 ml	SDS (20%)
	1000 ml	Aq. Dest.
TBST	150 mM	NaCl
	7,7 mM	Tris- HCl
	1% (V/V)	Tween 20

Tab. 7 Primer

mRNA	Produktbezeichnung	Hersteller
GAPDH	QuantiTect® Primer Assay Hs_GAPDH_2_SG	QIAGEN GmbH, Hilden (Deutschland)
GLI1	QuantiTect® Primer Assay Hs_GLI1_1_SG	QIAGEN GmbH, Hilden (Deutschland)
PTCH1	QuantiTect® Primer Assay Hs_PTCH1_1_SG	QIAGEN GmbH, Hilden (Deutschland)
SHH	QuantiTect® Primer Assay Hs_SHH_3_SG	QIAGEN GmbH, Hilden (Deutschland)
SMO	QuantiTect® Primer Assay Hs_SMO_1_SG	QIAGEN GmbH, Hilden (Deutschland)

Tab. 8 Primärantikörper

Zielprotein	Produktbezeichnung	Spezies	Hersteller
GLI1	GLI1 (L42B10) Mouse mAb #2643	Maus	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, Massachusetts (USA)
β -Actin	Monoclonal Anti- β -Actin	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (Deutschland)

Tab. 9 Sekundärantikörper

Ziel	Konjugation	Hersteller
Maus	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (Deutschland)

Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, Kulturflaschen, Eppendorf-Gefäße, Röhrchen, 6-Well-Platten, 96-Well-Platten o.ä. waren im Bestand des Instituts für chirurgische Forschung vorhanden. Die Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (Deutschland), Biozym Scientific GmbH, Oldendorf (Deutschland), Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland), Sarstedt AG, Nümbrecht (Deutschland), Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (Deutschland), PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen (Deutschland).

4.2 Methoden

4.2.1 Zelllinien

Gearbeitet wurde mit etablierten humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien. Capan-1 wurde von der deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur GmbH (DSMZ) in Braunschweig (Deutschland) bezogen, Panc-1 von der American Type Culture Collection (ATCC) in Manassas (Virginia, USA).

Zellkultur

Zellen wurden routinemäßig bei 37,5° C und 95% Luftfeuchtigkeit sowie 5% CO₂-Atmosphäre in Poly-D-Lysin-beschichteten Polystyren-Flaschen kultiviert, wo sie am Boden anwuchsen. Zellen der Zelllinie Capan-1 wuchsen in RPMI 1640-Medium, Panc-1-Zellen in DMEM-Medium. Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Wenn zum Zentrifugieren oder Inkubieren Zellen aus der Sterilwerkbank entnommen werden mussten, geschah dies nur in geschlossenen Gefäßen mit Schraubverschluss (Kulturflaschen oder Röhrchen). Ansonsten ruhten die Flaschen im Inkubator. Bei jedem neuen Arbeitsschritt wurde eine neue, sterile Pipettenspitze verwendet, um die Kontaminationsgefahr so gering wie möglich zu halten. Alle benötigten Medien und Zusätze wurden vor Beginn der Arbeit in einem Wasserbad auf 37° C erwärmt. Die Zellen wurden routinemäßig auf Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Für die Experimente wurden nur unkontaminierte Zellen verwendet.

Passagieren

Ab einem Konfluenzgrad in der Kulturflasche von ungefähr 80% wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Medium entfernt, die Kulturflasche mit ca. 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) ausgewaschen, das PBS entfernt und danach Trypsin hinzugegeben. In mittelgroße Flaschen (75 cm²) wurde 2 ml Trypsin gegeben, in große Flaschen (175 cm²) 3,5 ml Trypsin. Die trypsinierten Zellen wurden dann für 5-7 min in den Inkubator gestellt, um das Trypsin wirken zu lassen und die Zellen abzulösen. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in jeweils ein Röhrchen pro behandelte Flasche überführt und mit der dreifachen Menge des der Zelllinie entsprechenden Mediums (RPMI 1640 oder DMEM) versetzt, um die Aktivität des Trypsins durch im Medium enthaltenes FBS (Fötale Kälberserum) zu stoppen. Die

Röhrchen wurden dann bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert, um ein bodenständiges Zellpellet zu erhalten. Nach entfernen des überständigen Mediums wurde das Pellet mit dem der Zelllinie entsprechendem Medium resuspendiert, eine entsprechende Menge Zellsuspension in eine neue Kulturflasche überführt und mit Medium aufgefüllt, um ein der Kulturflasche entsprechendes Volumen an Gesamtmedium zu erhalten (15 ml in mittelgroßen und 25 ml in großen Flaschen).

Gemcitabin-resistente Zelllinien

Um Gemcitabin-resistente (GR) Zelllinien zu erhalten, wurden Gemcitabin-sensitive wildtyp- (wt-) Capan-1 und Panc-1 Zelllinien durch chronische Gemcitabinexposition sukzessive an steigende Konzentrationen adaptiert. Hierzu wurden die Zellen anfangs in einer Konzentration von 10 nM Gemcitabin kultiviert. Nach jeweils ca. zwei Passagen stabilen Wachstums wurde die Gemcitabinkonzentration verdoppelt. Die Zielkonzentration, bei der die Zellen stabil proliferierten, war bei der Zelllinie Capan-1 10 µM und bei Panc-1 1 µM Gemcitabin.

Zellzählung

Wenn für Versuche eine bestimmte Anzahl von Zellen eingesetzt werden musste, wurde diese mittels manueller Zellzählung bestimmt. Hierzu wurde aus der nach dem Passagieren gewonnenen Zellsuspension unter gründlicher Durchmischung ein Volumen von 10 µl unter das Deckgläschen einer Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop wurden in den einzelnen vier Quadranten der Zählkammer die Zellen ausgezählt und hieraus der arithmetische Mittelwert gebildet, der dann der $\text{Zellzahl} \cdot 10.000/\text{ml}$ entsprach. Dieser Wert wurde hochgerechnet auf das gesamte Volumen der Zellsuspension, worauf man die Gesamtzellzahl der beim Passagieren gewonnenen Zellen erhielt.

Einfrieren und Auftauen

Zellen, die zu einem später geplanten Versuch wieder benötigt wurden, konnten durch Einfrieren mit einem speziellen Einfriermedium konserviert werden. Hierzu wurden die Zellen zunächst passagiert und gezählt und währenddessen eine entsprechende Anzahl Gefrier Röhrchen auf Eis gestellt. Zum Einfrieren stand für Capan-1 Zellen R10-Einfriermedium sowie für Panc-1 Zellen D10-Einfriermedium bereit, das DMSO

(Dimethylsulfoxid) beinhaltet und deshalb die Bildung von Eiskristallen innerhalb der Zellen verhindert. Das Zellpellet wurde mit eiskaltem, der Zelllinie entsprechendem Einfriermedium resuspendiert, jedes Gefrier Röhrchen mit 1,5 ml Zell-Gefriermedium-Suspension befüllt und die Röhrchen ohne Verzug bei -80° C gelagert. Pro Gefrier Röhrchen wurde eine Zahl von ca. zwei Mio Zellen eingefroren.

Um beim Auftauen die Expositionszeit der Zellen gegenüber zytotoxischem DMSO zu verringern, wurden gefrorene Röhrchen in einem kleinen Glaskolben heißen Wassers aufgetaut. Der Inhalt des Röhrchens wurde dann in 15 ml Medium überführt, um die Konzentration an schädlichem DMSO zu verringern, und das Röhrchen bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert. Danach wurde mit dem Zellpellet verfahren wie bei der normalen Zellpassage.

4.2.2 Substanzen und experimentelle Grundlagen

Gemcitabin

Gemcitabin wurde in einer Konzentration von 144 mM in wässriger Lösung nach Herstelleranleitung aufgelöst und bei -20° C gelagert und bei Bedarf aufgetaut. Es wurden jeweils Zwischenverdünnungen von 1 mM und 10 µM in PBS hergestellt. Zur Applikation in der Zellkultur wurde Gemcitabin mit einer Pipette in die Kulturflasche gegeben und die Flasche geschwenkt.

NVP-LDE225

Der niedermolekulare SMO-Inhibitor NVP-LDE225 (LDE225) stand als reines kristallines Pulver zur Verfügung. LDE225 hat eine Molekulargewicht von $M = 485,5 \text{ g/M}$. Um keine Kristalle auszufällen, wurde LDE225 mit einer Konzentration von 20 mM/l in 100% DMSO gelöst. Die benötigte Menge m an LDE225 für einen ml DMSO wurde aus der Formel $m = n \cdot M$ berechnet und mit der Feinwaage abgewogen, mit dem entsprechenden Volumen DMSO versetzt und für mindestens eine Minute stark gevortext. Der Vorrat an LDE225 in DMSO wurde bei -20° C eingefroren.

Zusammensetzung aus Medium und Wirkstoff für Experimente

Zur Herstellung von experimentellen Konzentrationen an LDE225, Gemcitabin, oder beidem zusammen in Kulturmedium wurde unter der Sterilwerkbank zunächst eine

entsprechende Menge an Medium in einem 50 ml-Röhrchen bereitgestellt. Die für die Zielkonzentration benötigte Menge des Wirkstoffs n_1 wurde mit der Formel $n_1 = n_2 \cdot c_2 / c_1$ berechnet. Nach Zugabe des Wirkstoffs wurde das verschlossene Röhrchen gründlich gevortext.

Aussäen und Ernten der Zellen in 6-Well-Platten

Um für Experimente Zellen in voneinander getrennten Kompartimenten zu kultivieren und diese mit unterschiedlichen Konzentrationen der Wirkstoffe LDE225 und Gemcitabin zu behandeln zu können, wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Hierzu wurde zunächst nach dem üblichen Schema passagiert und die Zellzahl bestimmt. Bei Capan-1 wurden 200.000 Zellen pro Well, bei Panc-1 aufgrund der höheren Proliferationsrate 50.000 Zellen pro Well zusammen mit jeweils 2 ml des der Zelllinie entsprechenden Mediums ausgesät. Hierauf wurden die Zellen über Nacht für ca. 24 h inkubiert, um ihnen ausreichend Zeit für die Anhaftung am Boden der Wells zu gewähren. Am Folgetag wurden die Wirkstoffe vorbereitet, die Zellen aus dem Inkubator entnommen, das Medium entfernt und pro Well 2 ml des mit dem entsprechenden Wirkstoff versetzten Mediums rasch hinzugegeben, damit die Zellen im Luftstrom der Sterilbank nicht austrockneten. In jedem Versuch wurden gleichzeitig unbehandelte Kontrollen kultiviert, die keinen Wirkstoff erhielten.

Für jedes Zeitintervall, in dem Zellen untersucht werden sollten, wurden eigene Wells inkubiert. Um technische Fehler zu minimieren, wurde jede Zellfraktion zudem in Dreifachansätzen (Triplikaten) ausgesät. Die Zellen wurden zum entsprechenden Zeitintervall durch Entfernen des Mediums, Waschen mit 1 ml PBS sowie Inkubation mit 0,5 ml Trypsin für 5-7 min geerntet und dann mit unsterilem Medium gestoppt. Nachfolgende Experimente mit abgeernteten Zellen, die keine sterilen Bedingungen voraussetzen, wurden nicht mehr unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

4.2.3 Versuche zur zellulären Proliferation

Manuelle Zellzählung

Zur Bestimmung einer Wachstumskurve mittels manueller Zellzählung wurden geerntete Zellen wie in der *Zellzählung* mit der Neubauer-Zählkammer gezählt und das

arithmetische Mittel der Zellen aus drei Wells errechnet. Hierfür wurden jeweils die unbehandelte Kontrolle und LDE225-Konzentrationen von 10, 50 und 100 μM (für Capan-1-Zellen) bzw. 10, 30 und 50 μM (für Panc-1-Zellen) verglichen. GR-Capan-1-Zellen wurden zusätzlich mit 10 μM Gemcitabin, GR-Panc-1-Zellen mit 1 μM Gemcitabin inkubiert.

xCELLigence

Die Messung der zellulären Proliferation wurde für jede Zelllinie zusätzlich mit dem xCELLigence Real Time Cell Analysis (RTCA) System durchgeführt. Dieses Messverfahren erfasst in Echtzeit Änderungen der Impedanz am Boden spezieller 96-Well-Platten, die mit Goldelektroden beschichtet sind. Durch Anhaftung, Ausbreitung/Vergrößerung und Proliferation der Zellen vergrößert sich die Impedanz am Boden der Wells, wird vom Gerät in Echtzeit erfasst und in einen dimensionslosen Zellindex (CI) umgerechnet. Die zeitabhängige Differenz des Zellindex ($\Delta \text{CI}/\text{h}$) repräsentiert somit die Proliferation der eingesetzten Zellen. Das System kann Messungen im Abstand von Minuten oder gar Sekunden durchführen kann und macht somit ein lückenloses Monitoring der zellulären Proliferation möglich (Abb. 5).

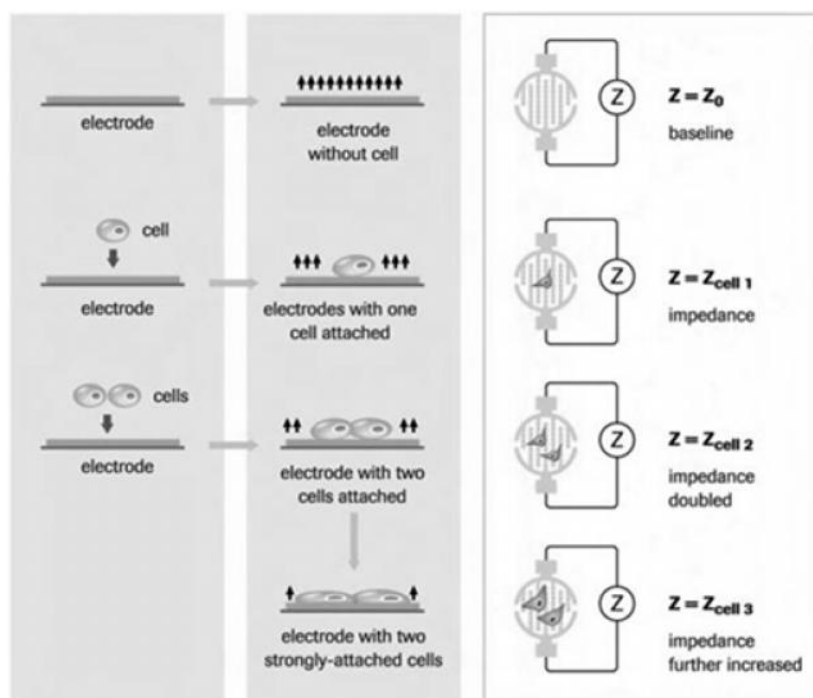


Abb. 5 Funktionsprinzip des xCELLigence Systems. Grundlage der Berechnung der Impedanzwerte sind Änderungen in der Bedeckung der Goldelektroden durch zelluläres Material (Abbildung aus RTCA SP Instrument Operator's Manual, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg)

Es wurden jeweils die unbehandelte Kontrolle und LDE225-Konzentrationen von 10, 50 und 100 μM (für Capan-1-Zellen) bzw. 10, 30 und 50 μM (für Panc-1-Zellen) verglichen. GR-Capan-1-Zellen wurden zusätzlich mit 10 μM Gemcitabin, GR-Panc-1-Zellen mit 1 μM Gemcitabin inkubiert. Um einen Vergleichswert mit der LDE225-Monotherapie zu erhalten, wurden desweiteren GR-Zellen in Monotherapie mit ihrer jeweiligen IC_{50} -Konzentration von LDE225 inkubiert und mit GR-Capan-1 (10 μM Gemcitabin + 50 μM LDE225) bzw. GR-Panc-1-Zellen (1 μM Gemcitabin + 10 μM LDE225) in Kombinationstherapie verglichen. Um eine Einflussnahme von DMSO auf das Zellwachstum auszuschließen, wurden außerdem unbehandelte Zellen mit der Konzentration an DMSO versetzt, die der jeweils höchsten angewendeten LDE225-Konzentration entsprach.

	Kontrolle	Mono LDE225	Mono Gemc.	LDE225 + Gemc.
wt-Capan-1	k. Wirkstoff, 0,5% DMSO	100, 50, 10 μM	-	-
GR-Capan-1	k. Wirkstoff, 0,5% DMSO	100, 50, 10 μM	10 μM	50 μM LDE225 10 μM Gemc.
wt-Panc-1	k. Wirkstoff 0,25% DMSO	50, 30, 10 μM	-	-
GR-Panc-1	k. Wirkstoff 0,25% DMSO	50, 30, 10 μM	1 μM	30 μM LDE225 1 μM Gemc.

Tabelle 10: In den Versuchen zur Proliferation verwendete Wirkstoffe und Konzentrationen.

GR-Zelllinien wurden sowohl mit der Monotherapie mit LDE225 auch mit der Kombinationstherapie aus LDE225 und den ihnen entsprechenden Gemcitabin-Konzentration versehen. Die Messung wurde gestartet und die Platte über Nacht inkubiert, um die Anhaftung und Proliferation der Zellen am Boden der Wells zu gewährleisten. Am Folgetag erfolgte die Zugabe des Wirkstoffs in 200 μl Gesamtvolumen. Es wurden in GR-Zelllinien Messungen mit und ohne Gemcitabin durchgeführt.

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mithilfe der RTCA-Software. Um geringe Unterschiede zwischen den Wells auszugleichen und um die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Experimente sicherzustellen, wurden die CI der verschiedenen

Zelllinien zum ersten Messzeitpunkt nach Zugabe des Wirkstoffs durch die Software normalisiert, womit der CI-Wert auf 1 gesetzt wird. Stark vom Mittelwert abweichende Wells wurden bei der Berechnung nicht berücksichtigt. Das Signifikanzniveau für Unterschiede des CI wurde in allen Versuchen einzig für den Messzeitpunkt 72 h bestimmt (s. Kap.4.2.7). Die Verdopplungsrate in An- oder Abwesenheit von LDE225 wurde anhand des zeitabhängigen Verlaufs des normalisierten CI berechnet. Die IC₅₀ von LDE225 auf die zelluläre Proliferation – also die Konzentration, bei der die Hälfte aller Zellen nicht mehr proliferiert – konnte mithilfe der Wachstumskurven bei unterschiedlichen Konzentrationen für jeden beliebigen Zeitpunkt nach Zugabe gemessen werden.

4.2.4 Versuche zur Zellzyklus- und Apoptosebestimmung

Die Phasenverteilung im Zellzyklus und die Apoptoserate wurden mittels Durchflusszytometrie im (fluorescence activated cell sorting, FACS) bestimmt. Um Einflüsse der beiden untersuchten Chemotherapeutika auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurden alle verwendeten Zellen als unbehandelte Kontrolle, unter LDE225-Monotherapie, unter Gemcitabin-Monotherapie, sowie unter Kombinationstherapie inkubiert. Verwendete Konzentrationen sind Tab. 11 zu entnehmen.

	Kontrolle	Mono LDE225	Mono Gemc.	LDE225 + Gemc.
wt-Capan-1	k. Wirkstoff	50 µM	100 nM	50 µM LDE225 100 nM Gemc.
GR-Capan-1	k. Wirkstoff	50 µM	10 µM	50 µM LDE225 10 µM Gemc.
wt-Panc-1	k. Wirkstoff	30 µM	10 nM	30 µM LDE225 10 nM Gemc.
GR-Panc-1	k. Wirkstoff	30 µM	1 µM	30 µM LDE225 1 µM Gemc.

Tabelle 11: In FACS-Experimenten verwendete Konzentrationen von LDE225 und Gemcitabin.

Zellen wurden nach 24, 48, 72 und 96 h geerntet. Nach Abpipettieren des Überstands wurden die Zellen in PBS resuspendiert, um verbleibendes Zellmedium weitestgehend zu entfernen. Die Zellen der ersten Probe wurden gezählt und erneut bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einem bestimmten Verhältnis zu gleichen Teilen in aq. dest. und Teil Propidium-Iodid-Lösung (PI) gelöst. Für die unbehandelte Kontrolle wurde die Zahl der geernteten Zellen mittels manueller Zählung ermittelt, pro 100.000 Zellen wurden je 100 µl aq. dest. und PI verwendet. Das so ermittelte Volumen wurde für alle Proben desselben Versuchsintervalls verwendet. Die Zellpellets wurden mindestens zehn Mal resuspendiert und für 30 min bei 4° C in einen Dunkelraum gelagert. Nach Ablauf der 30 min wurden die Proben gründlich gevortext und dann im Zytometer hinsichtlich ihres DNA-Gehalts mit der Attune Cytometric Software Version 1.2 gemessen. Die Verteilung der Zellzyklusphasen wurde mithilfe der Software Flowjo Version 7.6.5 unter Anwendung des Watson-Modells zur Zellzyklusanalyse ausgewertet.

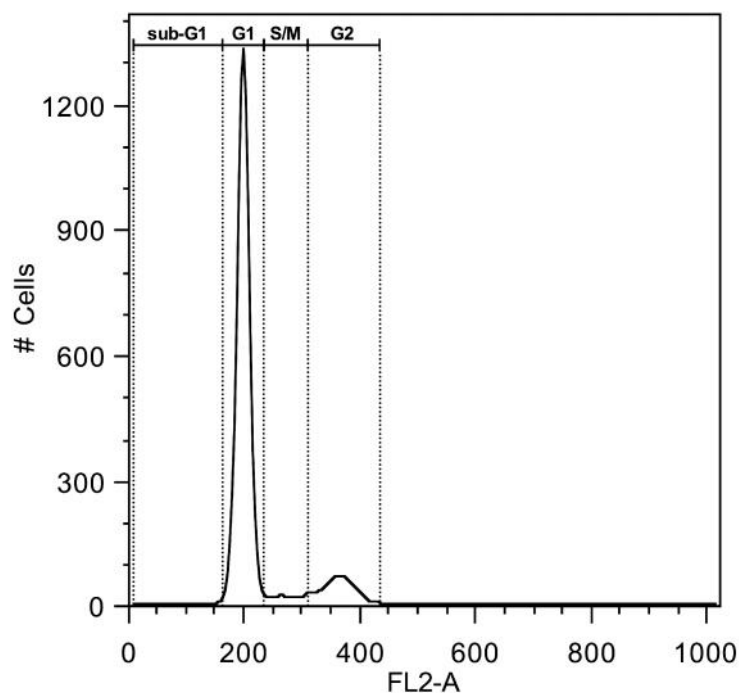


Abb. 6 Zweipfliges Histogramm nach FACS-Analyse PI-markierter Zellen. Dargestellt ist die Zellzyklus-Verteilung in einer FACS-Analyse der Zelllinie wt-Capan-1 ohne Behandlung.

PI-Lösung ist eine hypotone Lösung, die mit Triton versetzt ist und die Zellmembran auflöst. PI ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in die DNA interkaliert. DNA-gebundenes PI hat eine um das 20- bis 30-fach erhöhte Fluoreszenzintensität als nicht-

gebundenes PI (Arndtjovin and Jovin, 1989). Die Menge an PI, das mit der DNA interkaliert, hängt vom DNA Gehalt der Zelle in der jeweiligen Zellzyklusphase ab. Somit kann aufgrund der Fluoreszenzintensität die Zellzyklusphase ermittelt werden, da in den unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen auch unterschiedlich viel DNA vorhanden ist. Während in der G1-Phase der diploide Chromosomensatz $2n$ vorliegt, ist er in der G2-Phase verdoppelt ($4n$). In der S-Phase liegt die Menge an DNA dazwischen. Aus diesem Grund ergibt sich bei der FACS-Analyse ein zweigipfliges Histogramm, wie Abb. 6 schematisch zeigt.

4.2.5 Quantitative Echtzeit-PCR (rt-qPCR)

Zellen wurden mit 50 μM LDE225 (Capan-1) bzw. 30 μM LDE225 (Panc-1) behandelt. Es wurde außerdem eine unbehandelte Kontrolle ausgesät. Alle GR-Zellen wuchsen unter 10 μM Gemcitabin (GR-Capan-1) bzw. 1 μM Gemcitabin (GR-Panc-1). Erntezeitpunkte waren nach 24, 48, 72 und 96 h. Zur Durchführung der rt-qPCR waren danach vorbereitende Arbeitsschritte erforderlich.

4.2.5.1 Vorbereitung der rt-qPCR

RNA-Extraktion

Die Extraktion zellulärer RNA erfolgte mit dem RNEasy Mini Kit nach Anleitung des Herstellers. Das finale Auswaschen der RNA aus der Silizium-Säule erfolgte je nach erwartetem RNA-Gehalt mit 30-50 μl RNase-freiem Wasser in ein Eppendorfgefäß. Sofern nicht weiter benötigt, wurde die RNA bei -80°C gelagert.

Photometrische Bestimmung des RNA-Gehalts

In einem Photometer wurde die Absorption RNA-haltiger Lösung in RNase-freiem Wasser bei 260 und 230 nm Wellenlänge ermittelt und somit der RNA-Gehalt der Proben bestimmt. Zur Leerwertmessung wurden in einer Küvette 99 μl RNase-freien Wassers gemessen und nach Zugabe von 1 μl RNA-Lösung und äußerst sorgfältiger Resuspendierung in der Küvette die RNA-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten E_{260}/E_{230} sowie E_{260}/E_{280} dienten zur Feststellung der Qualität der Proben.

Synthese von cDNA

Um in der qPCR die Expression von Genen bestimmen zu können, musste aus den RNA-Proben komplementäre DNA (cDNA) hergestellt werden. Hierzu stand das iScript™ cDNA Synthesis Kit zur Verfügung, dessen beiliegendes Protokoll als Vorlage diente. Es wurden pro RNA-Probe 4 µl 5x iScript™ Reaction Mix sowie 1 µl iScript™ Reverse Transcriptase benötigt. Die Reagenzien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Zur Herstellung von 20 µl cDNA wurde 1 µg RNA benötigt, weshalb das benötigte Volumen aus dem zuvor bestimmten RNA-Gehalt errechnet wurde. Nach Zugabe der Reagenzien zur RNA wurde das Volumen mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und alle Proben schließlich gevortext. Im Thermocycler wurde die RNA nach dem Schema in Tab. 12 inkubiert. cDNA-Proben wurden bei -20° C gelagert.

Dauer	Temperatur
5 min	25° C
30 min	42° C
5 min	85° C

Tab. 12 Temperaturzyklus der cDNA-Synthese

4.2.5.2 Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR

Die rt-qPCR wurden mit Hilfe der gewonnenen cDNA-Proben, dem SsoFast™ EvaGreen® Supermix Kit sowie den gewünschten Gen-spezifischen Primern in geeigneten 96-Well-Platten nach Herstelleranleitung durchgeführt. Alle Arbeitsschritte bei der Vorbereitung der PCR-Platte wurden dabei auf Eis durchgeführt.

Herstellung des Mastermix

Es wurde für jeden eingesetzten Primer ein sogenannter Mastermix angesetzt, in dem bis auf die cDNA alle für die PCR benötigten Inhaltsstoffe enthalten waren. Pro Well wurde ein Gesamtvolumen von 20 µl angewendet, wovon 19 µl auf den Mastermix entfielen und 1 µl auf die jeweilige cDNA.

Die Gesamtmenge an benötigtem Mastermix berechnete sich aus folgender Formel:

$$V(M) = (w+2) \cdot (V(\text{SsoFast}^{\text{TM}} \text{ EvaGreen}^{\text{®}} \text{ Supermix}) + V(\text{Primer}) + V(\text{Nuklease-freies Wasser})),$$

wobei w für die Anzahl an benötigten Wells stand und darüber hinaus Mastermix für zwei zusätzliche Wells exklusive angefertigt wurde, um den Verlust durch wegen eventueller Ungenauigkeiten beim Pipettieren zu berücksichtigen. Schließlich wurde jeder Mastermix gevortext, abzentrifugiert und 19 µl in jedes vorgesehene Well der 96-Well-Platte pipettiert.

Die proportionsgerechte Verteilung der Komponenten des Mastermix ist Tab. 13 zu entnehmen.

Komponente	Volumen*(w+2)
1. SsoFast™ EvaGreen® Supermix	10 µl
2. Primer	2 µl
3. Nuklease-freies Wasser	7 µl
4. cDNA (nicht zum Mastermix)	1 µl

Tab. 13 Bestandteile der für die PCR benötigten Reagenzien. Die Positionen 1 bis 3 sind Bestandteil des Mastermix.

Pipettieren der Proben

In jedes Well wurden zunächst 19 µl Mastermix pipettiert, anschließend 1 µl der jeweiligen cDNA Probe. Hierbei wurden Dreifachansätze verwendet. Nach Befüllung aller vorgesehenen Wells wurde die 96-Well-Platte mit einer selbstklebenden Kunststofffolie luftdicht versiegelt und für 30 s bei 2000 U/min zentrifugiert, um Luftblasen am Boden der Wells zu entfernen.

Standardkurve

Um die Reaktionseffizienz des qPCR Laufes quantifizieren zu können, wurde dieser anhand einer sogenannten Standardkurve mit 5-stufig verdünnten cDNA-Konzentrationen berechnet. Zur Herstellung dieser Reihe wurden aus allen eingesetzten cDNA-Proben jeweils 1 µl entnommen (Verdünnung 1:1) und eine cDNA-Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser angerfertigt (1:10 – 1:10.000) hergestellt. Die Verdünnungsreihe wurde für jeden verwendeten Primer in Doppelansätzen und analog zu den Proben pipettiert. Die Reaktionseffizienz wurde anschließend anhand der Standardkurven automatisch von der Software für jeden Primer ermittelt.

Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion

Die versiegelte Platte wurde im Thermocycler in der dafür vorgesehenen Haltevorrichtung befestigt, das Gerät geschlossen und das Programm gestartet, welches die in Tabelle 14 angegebenen Arbeitsschritte beinhaltet.

Programmschritt	Dauer	Temperatur
1. Initiale Enzymaktivierung	30 Sekunden	95° C
2. Denaturierung	5 Sekunden	95° C
3. Primer-Anlagerung, Synthese	5 Sekunden	60° C
4. 45 Zyklen der Schritte 2+3	Ca. 40 Minuten	65° C
5. Schmelzkurve	60 Intervalle á 5 Sekunden	65-95° C (+0,5° C /Intervall)

Tab. 14 Arbeitsschritte der qPCR zur Untersuchung von mRNA-Expresion

4.2.5.3 Auswertung der qPCR-Daten

Die Resultate der qPCR wurden mit der Software CFX Manager™ 1.6 durchgeführt und für jede Probe der Zyklus Cq ermittelt, während dem ein festgelegter Schwellenwert (threshold) überschritten wurde. Anhand des Schwellenwertes ermittelte die Software die Startmenge an RNA (SQ), die zu Beginn der Reaktion in jedem Well vorlag. Die logarithmierte SQ diente dann zur Berechnung der Genexpression. Um die Expression der untersuchten Gene innerhalb der einzelnen Proben zu quantifizieren, wurde die Expression dieser Gene zunächst auf das housekeeping-Gen GAPDH normalisiert. Die Genexpression in den behandelten Proben wurde anschließend mit der unbehandelten Kontrolle verglichen ($\Delta\Delta C_t$ -Methode).

Analyse der Baseline-Genexpression

Die Untersuchung der relativen Genexpression von GR-Zellen im Vergleich mit wt-Zellen erfolgte ebenfalls mit dem CFX Manager™ 1.6. Hierbei wurden die unbehandelten Kontrollen untersucht, um Unterschiede in der Genexpression beider Zelllinien in Abwesenheit von LDE225 zu vergleichen: Die GAPDH-normalisierte Expression des gewünschten Gens in den GR-Zellen der unbehandelten Kontrolle wurde zur (GAPDH-normalisierten) Genexpression von unbehandelten wt-Zellen ins

Verhältnis gesetzt. Die Expression in wt-Zellen wurde hierbei als 1 definiert; in GR-Zellen ergaben sich deshalb Werte, die relativ zu 1 waren.

Berechnung des Signifikanzniveaus

Zur Berechnung des Signifikanzniveaus für jeden Zeitpunkt wurden die SQ-Werte des jeweiligen Gens, normalisiert zum gemittelten GAPDH-SQ desselben Zeitpunkts, verwendet und mit der unbehandelten Kontrolle verglichen (s. Kap. 4.2.7).

4.2.6 Western Blot

Die Proteinexpression in den Zellen wurde durch Western Blot-Analyse bestimmt. Neben einer unbehandelten Kontrolle wurden Zellen mit 50 μ M LDE225 (Capan-1) bzw. 30 μ M LDE225 (Panc-1) behandelt. Alle GR-Zellen wuchsen unter 10 μ M Gemcitabin (GR-Capan-1) bzw. 1 μ M Gemcitabin (GR-Panc-1). Erntezeitpunkte waren nach 24, 48, 72 und 96 h.

Proteinisolation

Die Proteinisolation wurde auf Eis und alle Zentrifugationsschritte bei 4° C durchgeführt. Behandelte Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet, in ein Röhrchen überführt und durch Zentrifugieren pelletiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Zellpellet in PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Je nach Größe wurden die Pellets anschließend in 50–200 μ l eiskühlem RNeasy Lysis Buffer resuspendiert und gründlich gevortext. Das Lysat wurde dann in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und 30 min auf Eis gelagert, wobei alle 10 min gründlich gevortext wurde. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 13.000 U/min zentrifugiert, hernach der proteinhaltige Überstand in ein neues Eppendorf überführt und das Pellet verworfen. Die Proteinlysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80° C gelagert.

Bestimmung des Proteingehalts mittels BCA-Assay

Da für die korrekte Durchführung des Western Blot exakt gleiche Proteinmengen eingesetzt werden müssen, wurde der Proteingehalt der Proben mittels kolorimetrischer Messung in einem BCA -Assay bestimmt und in einem ELISA Reader der Absorptionskoeffizient gemessen. BCA steht hierbei für Bicinchoninsäure, ELISA für

enzyme linked immuno-sorbent assay. Es wurde das Pierce® BCA Protein Assay Kit unter Anwendung des Herstellerprotokolls eingesetzt. Zur Messung im ELISA Reader wurden die Proben in eine dafür vorgesehene 96-Well-Platte pipettiert: Zunächst wurden in jedem Well 200 µl einer Standard-ELISA-Reagenz, bestehend aus Reagenz A (Pufferlösung) und Reagenz B (Kupfersulfatlösung, beides Bestandteile des Kits) im Verhältnis 50:1, vorgelegt. Die Protein-Proben á 1 µl wurden mit 9 µl Jie's Buffer zu einem Gesamtvolumen von 10 µl verdünnt und in Duplikaten in ihre vorgesehenen Wells pipettiert. Zur Quantifizierung des Proteingehalts stand ein bei -20° C gelagerter Albuminstandard bereit, der in der Verdünnungsreihe 2000:1, 1500:1, 1000:1, 750:1, 500:1, 250:1, 125:1, 25:1 und 0 als Standardkurve diente und mit einem Volumen von je 10 µl ebenfalls in Duplikaten pipettiert wurde. Zur Kontrolle wurden zwei Leermessungen angesetzt, in denen lediglich 10 µl Jie's Buffer vorgelegt wurden. Die Platte wurde dann für 30 min bei 37° C inkubiert. Nach dem Farbumschlag zu grün-blau wurde bei einer Wellenlänge von 560 nm in einem ELISA Reader die Absorption gemessen. Zur Auswertung wurde mit Hilfe des Programms SOFTmax Pro 3.1.1 anhand der durch die Verdünnungsreihe erstellten Standardkurve der Proteingehalt der einzelnen Proben errechnet.

Gelguss

Zur elektrophoretischen Trennung der Proteine wurde ein 7%-iges Trenngel angefertigt, in dem während des Gellaufs die Auftrennung der Proteine erfolgte. Die unten angegebenen Reagenzien wurden gemischt, wobei TEMED als letztes hinzugefügt wurde. Das flüssige Rohgel wurde daraufhin in einen Gussrahmen gegeben, wo es innerhalb von 15 min aushärtete. Auch das Sammelgel, in dem die Proteinfraction beim Gellauf zunächst auf einer einheitlichen Frontlinie zusammenläuft, wurde nach der Zugabe von TEMED unverzüglich im flüssigen Zustand auf das im Gussrahmen befindliche, harte Trenngel gegossen. Zügig wurde von oben ein 15-zackiger Blotkamm in das noch flüssige Gel gesteckt, das bald danach aushärtete. Nach vorsichtiger Entfernung des Kamms blieben 15 Taschen mit je 25 µl Kapazität, in die im Folgenden die Proteine per Feinnadelpipette pipettiert wurden. Gussrahmen, Ständer und Blotkamm waren Teil des Mini PROTEAN® Kits.

Vorbereiten der Proteinproben

Zielwerte bei Ansetzen der zu trennenden Proteinproben waren eine Gesamtproteinmenge von 30 µg sowie ein Gesamtvolumen von 20 µl, um die Taschen nicht zu überfrachten. Zusätzlich musste das Gesamtvolumen jeder Tasche die exakt 1-fache Konzentration an Laemmli-Puffer aufweisen. Deshalb wurde für jede Probe das Volumen vorgelegt, in welchem 30 µg Protein enthalten waren, ein Fünftel des Volumens jeder Probe entfielen auf 5-fach konzentrierten Laemmli-Puffer und das bis 20 µl verbleibende Restvolumen wurde mit normal konzentriertem Laemmli-Puffer aufgefüllt. Die Proben wurden gevortext und für 10 min bei 70° C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren.

Elektrophoretischer Gellauf

In einer Gelelektrophorese-Kammer wurde das im Gussrahmen befindliche Gel eingespannt und die Blotkammer mit 10-fach verdünntem SDS Running Buffer gefüllt, bis die Oberkante des Gels vollständig unterhalb der Oberfläche war. Der Kamm wurde aus dem Gel gezogen und in jeweils eine Tasche wurde eine Probe sowie in eine weitere Tasche 6 µl PreStained Marker pipettiert. Für 65 min wurden 20 mA Stromstärke angelegt, um die Proteine das Sammelgel passieren zu lassen. Im Trenngel wurde für 65 min eine Erhöhung der Stromstärke auf 60 mA vorgenommen, um die Proteine effektiv zu trennen.

Tank Blot-Verfahren

Nach der Auftrennung der Proteine im Gel wurde dieses auf einer passend zugeschnittenen Immobilon®-P PVDF Nitrozellulosemembran platziert. Von beiden Seiten wurden je zwei Schichten Filterpapier angelegt, dieses Konstrukt in zwei Stoffmatten gebettet und letztlich in einen Blothalter gespannt. Dieser wurde in einer Tank Blot-Kammer fixiert, das Gel zeigte hierbei in Richtung Minus- und die Nitrozellulosemembran in Richtung Pluspol. Die Blotkammer wurde mit Blotpuffer gefüllt, bis der Blothalter vollständig unter der Oberfläche war. Hierauf wurde mit einer Stromstärke von 350 mA für 60 min geblottet, um die Proteine vom Gel auf die Membran zu übertragen.

Blocken der Membran, Behandlung mit primärem Antikörper und Darstellung der Banden

Die geblottete Membran wurde für 1 h in ECL Advance Blocking Reagent geblockt, einer proteinhaltigen Blockreagenz, um unspezifische Bindung des Antikörpers an der Membran zu verhindern. Das Proteinpulver war Inhalt des ECL Advance Western Blotting Detection Kit und wurde im Verhältnis 1:50 in TBS-T (Tris-buffered saline und Tween 20) gelöst. Der primäre Antikörper wurde im Verhältnis 1:1000 in Blockreagenz gelöst, die Lösung zusammen mit der geblockten Membran in einer Klarsichtfolie eingeschweißt und die Folie auf einem Shaker über Nacht bei 4° C inkubiert, um den primären Antikörper mit dem Zielprotein zu verbinden. Am Folgetag wurde die Folie aufgeschnitten und die Membran zum Waschen für 10 min in TBS-T auf den Shaker gestellt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und danach die Membran mit dem HRP-konjugierten (engl. horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase) sekundären Antikörper für 60 min inkubiert, der ebenfalls bei einer Konzentration von 1:1000 in Blockreagenz gelöst war. Wie schon beim primären Antikörper wurde die Membran danach dreimal für je 10 min in TBS-T gewaschen. Die Membran wurde nun mit einer Chemilumineszenz-Lösung aus dem ECL Advance Western Blotting Detection Kit benetzt, die zu gleichen Teilen aus Luminol/Enhancer und Stable Peroxide Buffer zusammengesetzt war, und mit dem optischen Signal in der Dunkelkammer für 2 Sekunden ein Film belichtet. Die Bilder wurden eingescannt und mit der Software Bio-1D Version 15.01 ihre optische Dichte analysiert und quantifiziert. Die Ladekontrolle wurde mit einem primären Antikörper gegen β -Actin durchgeführt.

4.2.7 Statistische Auswertung

Bei Experimenten in Dreifachansätzen wurden die Standardabweichung (SD) und, mittels eines zweiseitigen T-Tests, das Signifikanzniveau bestimmt. Alle Resultate mit einem p-Wert von $< 0,05$ wurden als signifikant gewertet. Zur Durchführung der Berechnungen wurde die Software Microsoft Excel 2007 verwendet.

5. Ergebnisse

Die kompletten Ergebnisse finden sich im Anhang (Tab. S1-S19, S. 104-116).

5.1 Zelluläre Proliferation

Versuche zur zellulären Proliferation wurden mittels manueller Zellzählung sowie mit dem xCELLigence Real time cell analysing (RTCA) system durchgeführt.

5.1.1 Manuelle Zellzählung nach Behandlung mit LDE225

Ziel dieser Versuchsreihe war es zunächst, das prinzipielle Ansprechen der Tumorzellen auf LDE225 zu beweisen. Die für die beobachteten Zelllinien ungefähr wirksamen Dosen an LDE225 waren aus Vorversuchen des Instituts für theoretische Chirurgie bekannt und liegen im mikromolaren (μM) Bereich. Zellen wurden deshalb mit 10, 50 und 100 μM LDE225 behandelt und die absolute und relative Zellzahl zu den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 h bestimmt.

5.1.1.1 Manuelle Zellzählung wt-Capan-1

In der unbehandelten Kontrolle proliferierten die Zellen beständig und zeigten ihr stärkstes Wachstum in der Anfangsphase, denn zu späteren Zeitpunkten wurde ein hoher Konfluenzgrad in den Wells erreicht (Daten nicht gezeigt). Unter 10 μM LDE225 zeigte sich bereits eine Verlangsamung der Vermehrung. Nach Behandlung mit 50 μM LDE225 vermochte die Zellzahl nicht mehr den Wert an initial ausgesäten Zellen zu übersteigen. Unter 100 μM LDE225 bewegte sich die Zellzahl konstant bei ca. 100.000, also der Hälfte der ursprünglich ausgesäten Zellen (Abb. 1).

5.1.1.2 Manuelle Zellzählung GR-Capan-1

Das Wachstum der unbehandelten Kontrolle erfolgte zu Beginn nicht in demselben Tempo wie bei den wt-Zellen, erreichte nach 96 h aber eine ähnlich hohe Gesamtzellzahl. Auch unter 10 μM LDE225 vermehrten sich die Zellen konstant, was am zeitlichen Verlauf der relativen Zellzahl besonders deutlich wird; sogar unter 50 μM war bis 72 h nach Wirkstoff-Zugabe noch Wachstum zu beobachten. Bei 100 μM LDE225 war das Wachstum stagnierend (Abb. 7).

GR-Capan-1-Zellen wurden in allen Wells mit 10 μ M Gemcitabin kultiviert, um die „realen“ Bedingungen aus der Zellkultur beizubehalten.

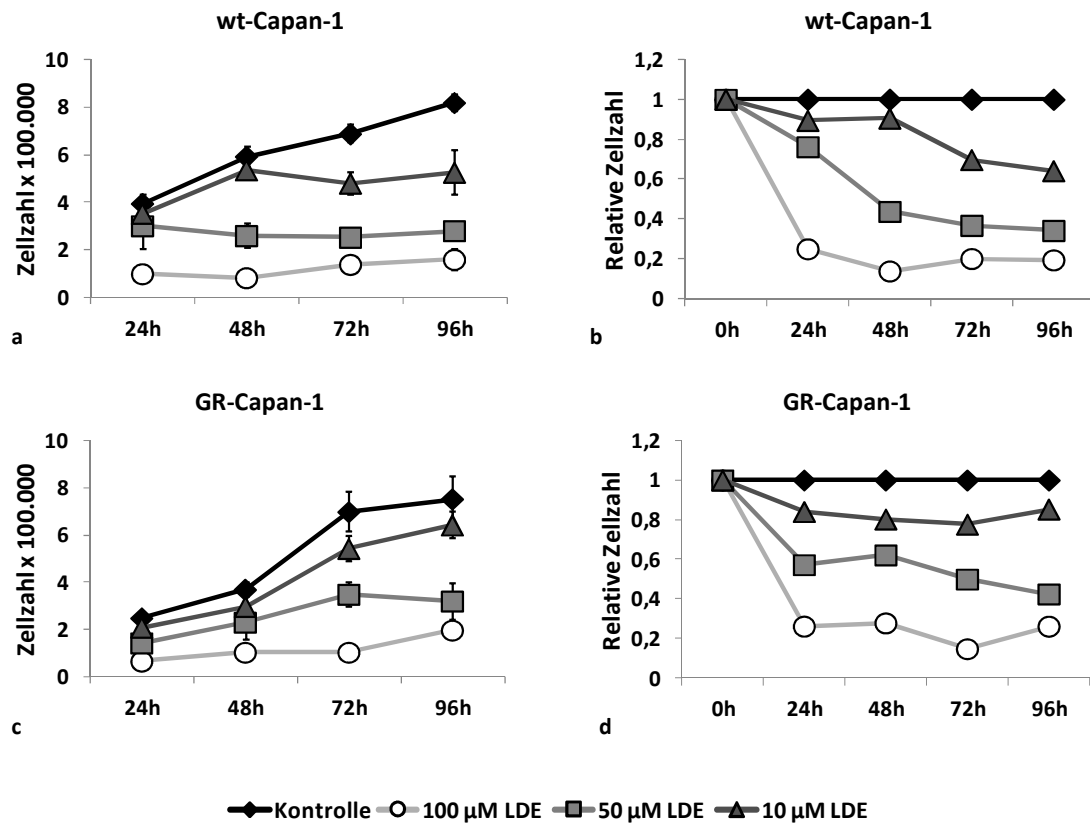


Abb. 7 (Tab. S1) Manuelle Zellzählung Capan-1 Absolute und relative Zellzahl von wt-Capan-1 (a, b) und GR-Capan-1-Zellen (c, d) nach Behandlung mit 100, 50 und 10 μ M LDE225. Auf der X-Achse ist die Inkubationszeit [h] aufgetragen.

5.1.1.3 Manuelle Zellzählung wt-Panc-1

wt-Panc-1-Zellen wurden mit denselben Konzentrationen LDE225 behandelt wie Capan-1-Zellen. Jedoch zeigten diese ein deutlich verstärktes Ansprechen bei 50 und 100 μ M, wo sie größtenteils abstarben. Bei geringeren Konzentrationen proliferierten sie jedoch rege: In der Kontrollgruppe sowie unter 10 μ M LDE225 war die absolute Zellzahl zu allen Zeitpunkten annähernd gleich (Abb. 8).

wt-Panc-1-Zellen wurden zu 50.000 Stück pro Well ausgesät, da aus Vorversuchen bekannt war, dass diese schneller proliferierten als Capan-1-Zellen und somit schneller einen kritischen Konfluenzgrad erreichen. Auf eine manuelle Zellzählung von GR-Panc-1-Zellen wurde aufgrund technischer Schwierigkeiten verzichtet.

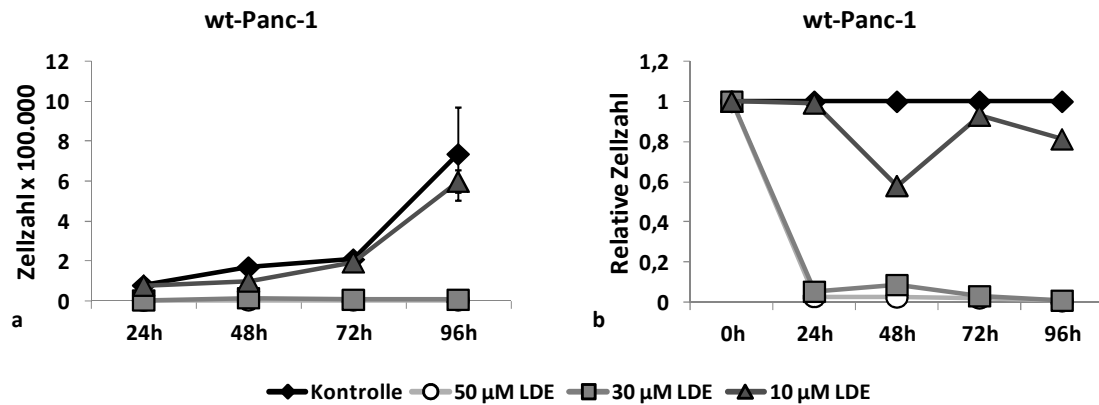


Abb. 8 (Tab. S2) Manuelle Zellzählung Panc-1 a) Absolute Zellzahl und b) Relative Zellzahl von wt-Panc-1-Zellen nach Behandlung mit LDE225. Auf der X-Achse ist die Inkubationszeit [h] aufgetragen.

5.1.2. Zelluläre Proliferation im xCELLigence RTCA Analyser

Als nächster Arbeitsschritt sollte die effektiv wirksame Konzentration von LDE225 bestimmt werden, um das Ansprechen der Zellen auf die Therapie quantitativ beschreiben zu können. Hierfür wurde mit einer Software die Konzentration von LDE225 errechnet, bei der die Hälfte aller Zellen nicht mehr proliferiert. Aufgrund der Begrenztheit der Mediumnährstoffe in der 96-Well-Platte des xCELLigence konnte ein Zeitfenster von maximal 72 h nach Compound-Zugabe zuverlässig beobachtet werden. Die IC_{50} wurde deshalb für den Zeitpunkt 72 h nach Zugabe berechnet.

5.1.2.1 Proliferation unbehandelter Capan-1 und Panc-1 Zellen

Zelllinie	IC_{50} nach 72h	Verdopplungszeit unbehandelt	Verdopplungszeit (bei LDE225- Konzentration)
Capan-1 wt	43 μ M	17 h $\pm 1,01$	28 h (50 μ M) ± 2.69
Capan-1 GR	58 μ M	23 h ± 1.23	40 h (50 μ M) ± 3.82
Panc-1 wt	29 μ M	20 h $\pm 0,21$	24 h (10 μ M) $\pm 0,31$
Panc-1 GR	7,6 μ M	55 h $\pm 1,32$	110 h (10 μ M) $\pm 7,1$

Tab. 15: Im xCELLigence ermittelte IC_{50} und Verdopplungszeit unbehandelter Zellen sowie von mit 50 μ M (Capan-1) bzw. 10 μ M (Panc-1) behandelten Zellen. Es wurde der Mittelwert der Quadruplikate errechnet. Die kleinen Zahlen in der zweiten Reihe sind die einfache Standardabweichung.

Um das grundlegende Wachstumsverhalten der untersuchten Zelllinien im xCELLigence zu untersuchen, wurden diese zunächst unbehandelt gemessen. Das schnellste Wachstum zeigten wt-Capan-1- sowie wt-Panc-1-Zellen mit einer Verdopplungszeit von 17 h und 20 h. Demgegenüber stand eine Verdopplungszeit der GR-Pendants von 23 h bei der Capan-1- und sogar 55 h bei der Panc-1-Zelllinie. Die kürzere Verdopplungszeit in wt-Zellen gegenüber ihren GR-Pendants zeigt an, dass das Erwerben von Gemcitabinresistenz mit einem Verlust von Proliferationsaktivität verbunden sein könnte (s. Tab. 15).

5.1.2.2 Proliferation von Capan-1 Zellen unter LDE225

Um effektive Konzentrationen von LDE225 zu determinieren, wurden darauf Capan-1 wt- und GR-Zellen wurden mit 100, 50, 30, 10, 5 und 1 μ M behandelt. GR-Zellen wuchsen vorerst ohne Gemcitabin, um den reinen LDE225-vermittelten Effekt auf die Proliferation zu erhalten. Wie aus Abb. 9 ersichtlich ist, zeigten die Zellen ein Dosis-abhängiges Proliferationsverhalten. Bei hohen Konzentrationen von 100 μ M zeigte sich bei wt-Zellen initial ein Absinken des normalisierten CI unter 1, was für vermehrtes Sterben von Zellen und somit einen zytotoxischen Effekt der Substanz spricht. Die Kurve stieg nach einem Tag jedoch wieder an. Dosen unterhalb von 10 μ M LDE225 zeigten keine Änderung des Proliferationsverhaltens (Daten nicht abgebildet).

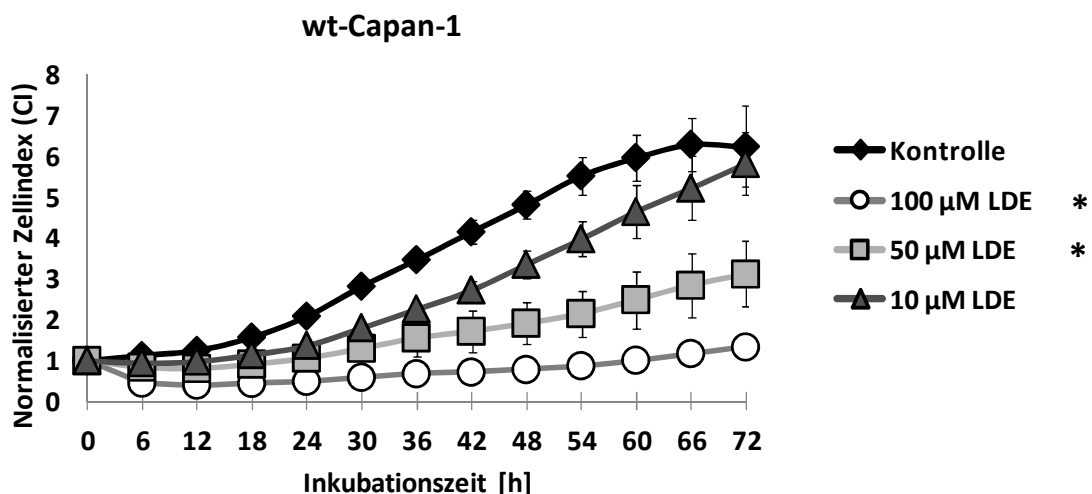


Abb. 9 (Tab. S3) xCELLigence wt-Capan-1, Monotherapie mit LDE225 Darstellung der zellulären Proliferation von wt-Capan-1-Zellen anhand des dimensionslosen Zellindex (CI) im xCELLigence RTCA system nach Behandlung mit LDE225 (Asterisken = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle bei 72 h).

Bei GR-Zellen war dieser Effekt unter 100 μM LDE225 gleichwohl nicht zu beobachten, die Zellen wuchsen langsam aber stetig weiter. Bei 50 μM LDE225 war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle immer noch eine reduzierte Proliferation auszumachen, die Verdopplungszeit betrug 30 h in wt-Zellen und 50 h in GR-Zellen. Geringere Konzentrationen hatten hingegen nur einen geringen Effekt auf wt-Zellen. Die Erhöhung des CI unter 10 μM LDE225 war indes nicht signifikant und konnte im manuellen Zählversuch nicht bestätigt werden (Abb. 10).

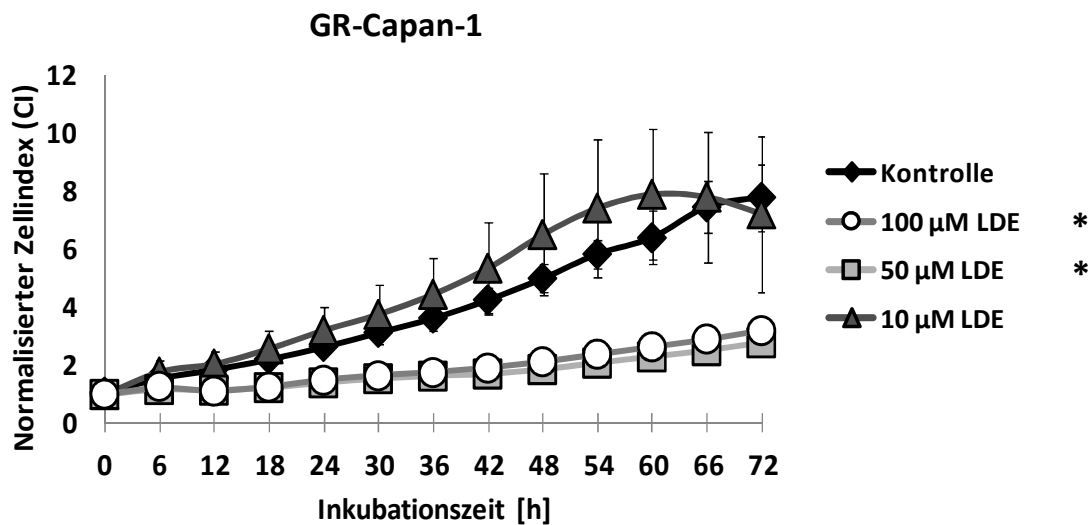


Abb. 10 (Tab. S4) xCELLigence GR-Capan-1, Monotherapie mit LDE225. Zelluläre Proliferation von GR-Capan-1-Zellen, gemessen im xCELLigence nach Behandlung mit LDE225 (Asterisken = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle bei 72 h).

5.1.2.3 Proliferation von Panc-1 Zellen unter LDE225

Die Behandlung erfolgte mit Konzentrationen von 50,30,20,10, 5 und 1 μM LDE225. Eine Konzentration von 50 μM LDE225, unter der zuvor Capan-1 Zellen noch gut proliferiert hatten, bewirkte bereits ein Absinken des CI unter 1 für die Dauer des gesamten Experiments sowohl in wt- als auch in GR-Zellen. Dies war auch in mit 30 μM behandelten Zellen zu beobachten; der inhibitorische Effekt auf die Proliferation war dosisabhängig, das heißt, bei niedrigeren Konzentrationen LDE225 wuchsen die Zellen schneller: 10 μM LDE225 verursachten nur noch eine geringe Verlangsamung des Wachstums (Abb. 11). Dosen unterhalb von 10 μM LDE225 zeigten keine Änderung des Proliferationsverhaltens (Daten nicht abgebildet).

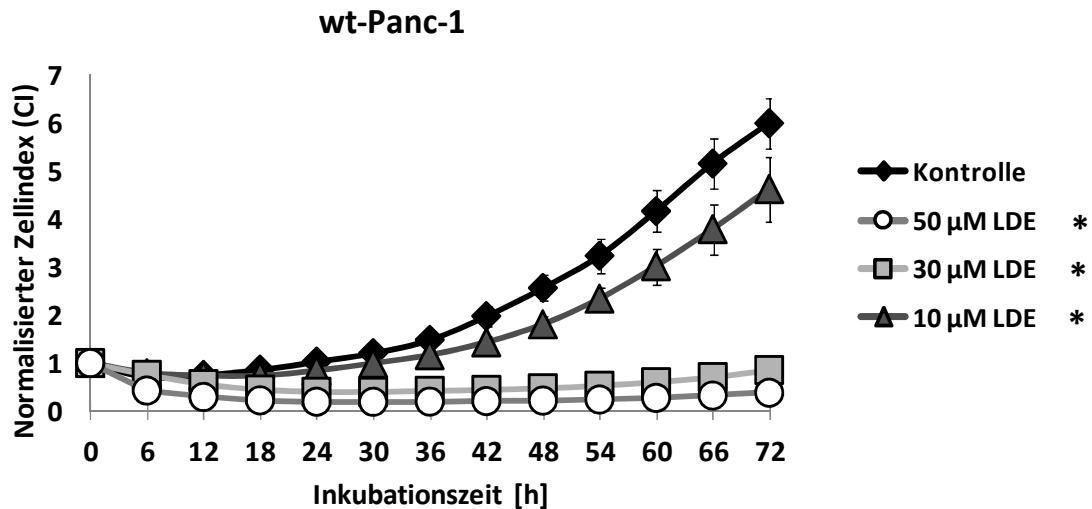


Abb. 11 (Tab. S5) xCELLigence wt-Panc-1, Monotherapie mit LDE225. Zelluläre Proliferation von wt-Panc-1-Zellen, gemessen im xCELLigence nach Behandlung mit LDE225 (Asterisken = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle bei 72 h).

Bei GR-Panc-1-Zellen war sowohl unter 50 µM LDE225 als auch unter 30 µM LDE225 ein deutlicher Rückgang des CI zu sehen. Der SMO-Inhibitor verursachte bei diesen Konzentrationen scheinbar ein Absterben der Zellen. Auch unter 10 µM war eine nur äußerst geringe Proliferation zu beobachten (Abb. 12).

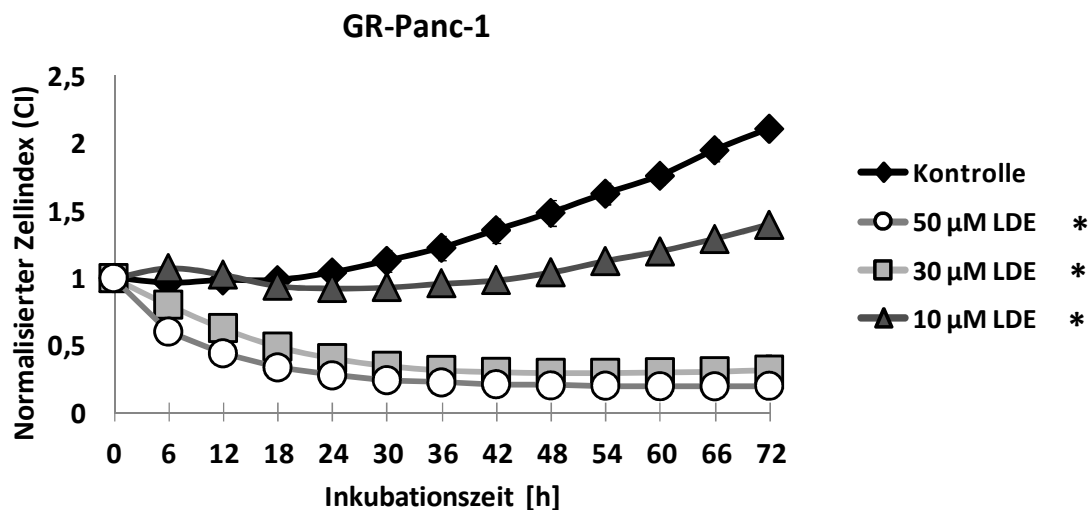


Abb. 12 (Tab. S6) xCELLigence GR-Panc-1, Monotherapie mit LDE225. Zelluläre Proliferation von GR-Panc-1-Zellen, gemessen im xCELLigence nach Behandlung mit LDE225 (Asterisken = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle bei 72 h).

Insgesamt war der proliferationshemmende Effekt von LDE225 bei Panc-1-Zellen stärker ausgeprägt als bei Capan-1-Zellen. GR-Panc-1-Zellen waren gegenüber der Substanz besonders empfindlich und zeigten bei 10 µM LDE225 eine deutlich erhöhte

Verdopplungszeit von 155 h, während wt-Zellen sich bei dieser Dosis innerhalb von 24 h verdoppelten (Tab. 15).

5.1.2.4 Bestimmung der Wirksamkeit von LDE225 anhand der IC_{50}

Das individuelle Wachstumsverhalten der unterschiedlichen Zelllinien war bei sehr hohen oder niedrigen Konzentrationen von LDE225 schwierig voneinander abzugrenzen. Während 100 μ M in Capan-1-Zellen und 50 μ M in Panc-1-Zellen die Proliferation völlig suprimierten, zeigten niedrigere Konzentrationen kaum einen Einfluss auf die Vermehrung der Zellen. Als Gradmesser für die Wirksamkeit der untersuchten Substanz definierten wir deshalb die IC_{50} , bei der nur die Hälfte der eingesetzten Zellen noch proliferiert. Diese betrug in wt-Capan-1 43 μ M und in GR-Capan-1 58 μ M. In wt-Panc-1 reduzierten 29 μ M die Proliferationsrate auf die Hälfte und in GR-Panc-1 7,6 μ M. Die Breite des Spektrums, in dem sich die verschiedenen IC_{50} befinden, ist beachtlich (Tab. 15).

5.1.2.5 Kombinationstherapie von LDE225 und Gemcitabin in GR-Zellen

Gemcitabinresistenz hatte einen Einfluss auf das Ansprechen beider Zelllinien auf LDE225. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob durch gleichzeitige Gabe beider Medikamente ein additiver Effekt erzeugt werden könne. Hierzu wurden in einem xCELLigence-Assay GR-Capan-1- und GR-Panc-1-Zellen in Kombination mit LDE225 und mit Gemcitabin behandelt. Pro Zelllinie wurden eine unbehandelte Kontrolle sowie eine mit LDE225-Monotherapie behandelte Kontrolle ausgesät, um einen Vergleichswert zu haben. In beiden Zelllinien gab es keinen relevanten Unterschied zwischen der Mono- und der Kombinationstherapie. Es ist also davon auszugehen, dass LDE225 das Ansprechen für Gemcitabin in GR-Zellen nicht erhöhen oder wiederherstellen kann (Abb. 13 und 14).

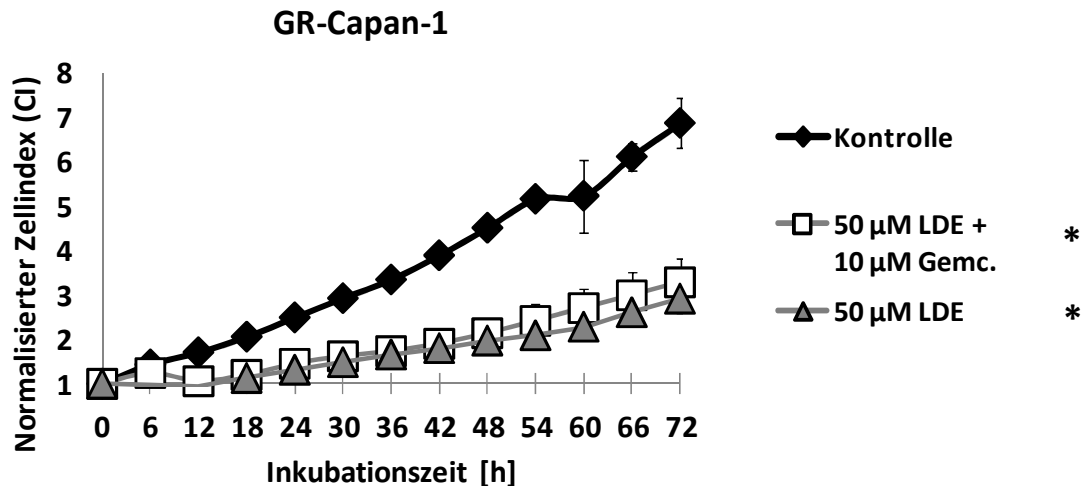


Abb. 13 (Tab. S7) xCELLigence GR-Capan-1, Mono- vs. Kombinationstherapie. Vergleich der Proliferation von GR-Capan-1-Zellen nach Monotherapie mit LDE225 sowie Kombinationstherapie mit LDE225 und Gemcitabin (Asterisken = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle bei 72 h).

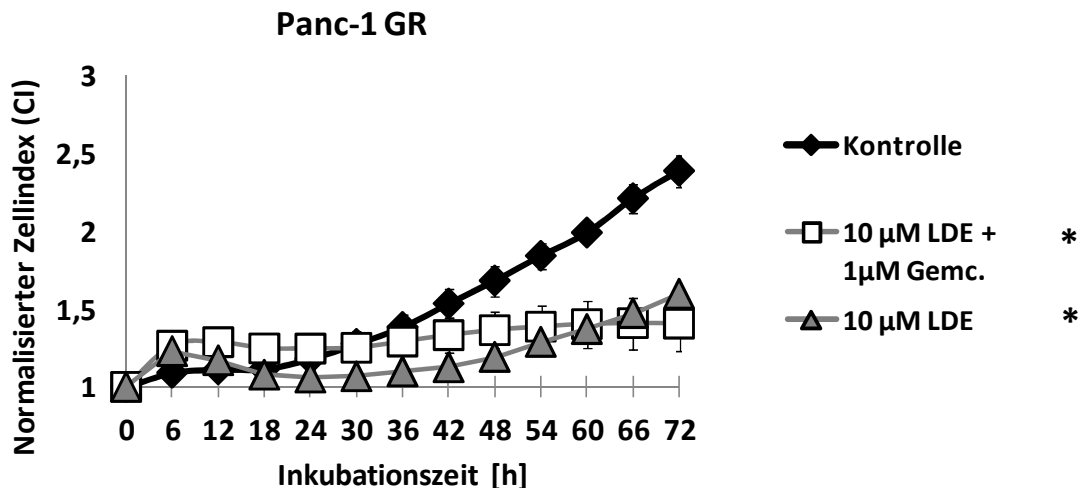


Abb. 14 (Tab. S8) xCELLigence GR-Panc-1, Mono- vs. Kombinationstherapie. Vergleich der Proliferation von GR-Panc-1-Zellen nach Monotherapie mit LDE225 sowie Kombinationstherapie mit LDE225 und Gemcitabin (Asterisken = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle bei 72 h).

5.1.2.6 Proliferation bei LDE225-proportionalen Konzentrationen von DMSO

Wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, war LDE225 bei einer Konzentration von 20 mM in 99,9%-igem DMSO gelöst. Der maximale Anteil von DMSO in LDE225-haltigem Kulturmedium erreichte bei Zellen mit 100 µM LDE225 ca. 0,5% und bei 50 µM ca. 0,25%. Es ist bekannt, dass ein DMSO-Anteil von bis zu 10% keinen nennenswerten zellulären Schaden in der Zellkultur hervorruft, der zytotoxische Effekt tritt erst bei über 10% Anteil auf (Da Violante et al., 2002). Um jedoch auszuschließen, dass der DMSO-Anteil in LDE225-behandelten Zellen für den beobachteten Verlust an Proliferation verantwortlich oder teilweise verantwortlich war, wurden alle vier untersuchten

Zelllinien (wt- und GR-Capan-1 sowie wt- und GR-Panc-1) mit der Menge DMSO behandelt, die der maximal eingesetzten Konzentration an LDE225 entsprachen (0,5% DMSO bei Capan-1 und 0,25% DMSO bei Panc-1). Im xCELLigence konnte in keiner der vier Zelllinien ein signifikanter Unterschied des CI der unbehandelten Kontrolle und der DMSO-behandelten Proben festgestellt werden. Die verminderte Proliferationsrate war somit nicht auf den Einfluss des DMSO zurückzuführen (Abb. 15).

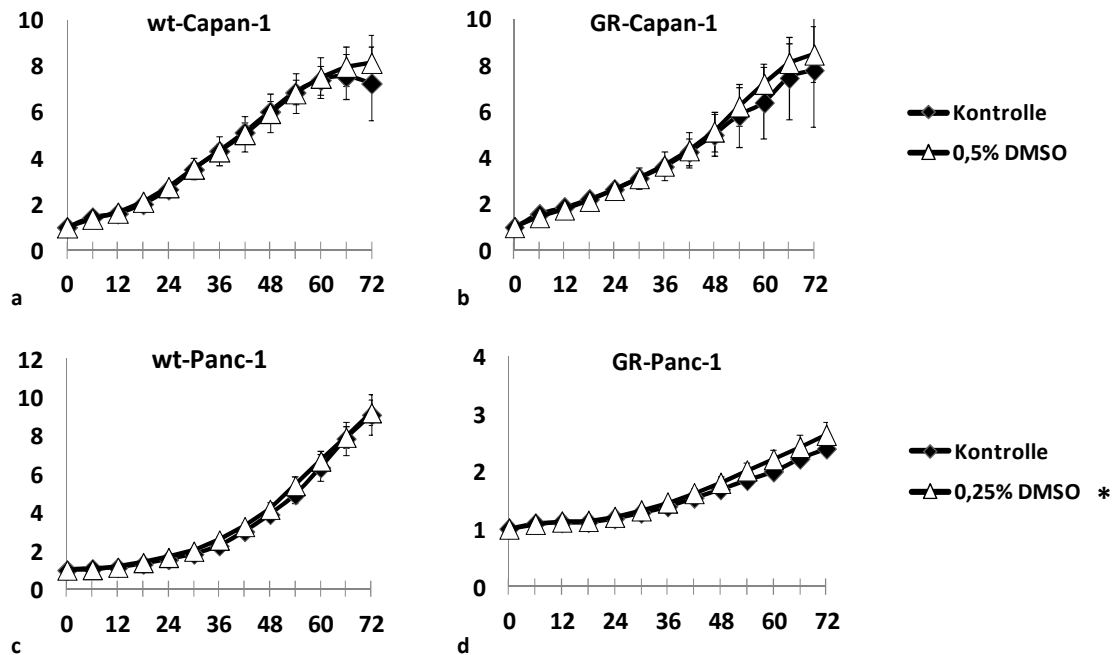


Abb. 15 (Tab. S9) xCELLigence, DMSO vs. Unbehandelte Kontrolle. Vergleich der unbehandelten Kontrolle sowie der mit 0,5% DMSO behandelten Capan-1-Zellen (a und b) bzw. der mit 0,25% DMSO behandelten Panc-1-Zellen (c und d). Auf der X-Achse ist die Zeit [h] nach Inkubation aufgetragen (Asterisken = $p < 0,05$ bei 72 h).

5.2 Analyse von Apoptose und Zellzyklus

Bekanntermaßen werden durch die Aktivierung des Hh-Signalwegs BCL-2 sowie andere antiapoptotische Proteine vermehrt exprimiert. Ob die beobachtete Inhibition des Zellwachstums nach LDE225-Gabe durch vermehrte Apoptose verursacht wurde, sollte durch FACS-Analyse LDE225-behandelter Zellen festgestellt werden. Um genügend lebendige Zellen zu messen und gleichzeitig einen verlässlichen Einfluss von LDE225 zu gewährleisten, wurden hierbei Konzentrationen verwendet, die approximativ den errechneten halbmaximal wirksamen Konzentrationen (IC_{50}) entsprachen und gleichzeitig für wt- und GR-Zellen gleich waren. Deshalb wurde die Zelllinie Capan-1 mit 50 μ M, Panc-1 mit 30 μ M LDE225 behandelt. GR-Zellen wurden, anders als in der Zellkultur, vorerst nicht mit Gemcitabin behandelt, um den unverfälschten Effekt der

Monotherapie beurteilen zu können. Messzeitpunkte für LDE225 und die unbehandelte Kontrolle waren an den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 h nach Zugabe des Compounds. sub-G1-Ereignisse wurden hierbei als Apoptose gewertet.

5.2.1 Apoptose nach Monotherapie mit LDE225 in Capan-1

wt-Capan-1-Zellen zeigten unter LDE225-Monotherapie an drei der vier Intervalle keine signifikant veränderte sub-G1-Fraktion gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Bei 48 h war eine leichte Erhöhung der sub-G1-Fraktion festzustellen, die jedoch nicht signifikant war.

In GR-Capan-1-Zellen war nach Behandlung mit LDE225 zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung der Apoptoserate zu beobachten. Auffällig war der hohe Anteil der sub-G1-Fraktion nach 24h, der für die drei nachfolgenden Intervalle jedoch deutlich abfiel; dies ist wahrscheinlich eine Folge der Dauerbehandlung Gemcitabin, unter der die Zellen zum Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe noch gestanden hatten.

Insgesamt waren in der Zelllinie Capan-1 sieben von acht Messungen mit LDE225 unauffällig. Bei wt-Zellen war nach 48 h eine Erhöhung der sub-G1-Fraktion zu beobachten, die zwar außerhalb der Standardabweichung lag, aber auch nicht signifikant war. LDE225 hat offenbar keinen Effekt auf die Apoptoserate dieser Zelllinie (Abb. 16).

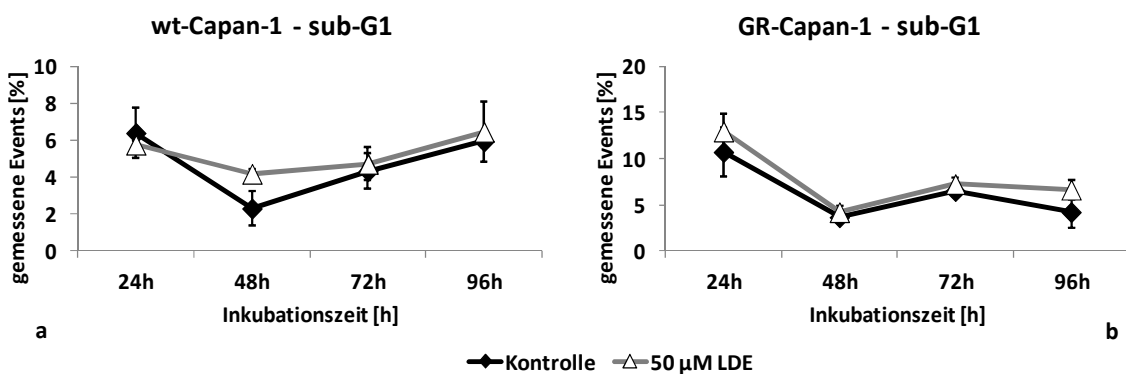


Abb. 16 (Tab. S10) FACS, subG1-Fraktion Capan-1 wt und GR. Darstellung der sub-G1-Fraktion in einer FACS-Analyse LDE225-behandelter Capan-1-wt-Zellen (a) und GR-Zellen (b). Die als Apoptoserate gewertete sub-G1-Fraktion nach Behandlung mit LDE225 war zu keinem Zeitpunkt signifikant erhöht.

5.2.2 Apoptose nach Monotherapie mit LDE225 in Panc-1

wt-Panc-1-Zellen zeigten 72 und 96 h nach Behandlung eine deutliche Erhöhung der sub-G1 Fraktion außerhalb der Standardabweichung, wobei bei 96 h die Erhöhung nicht signifikant war. Selbiges zeigte sich im GR-Modell, wo die Erhöhung ebenfalls nur bei 72 h signifikant war. Insgesamt ist davon auszugehen, dass drei bis vier Tage nach Behandlung mit LDE225 diese Zelllinie eine erhöhte Apoptose aufweist (Abb. 17).

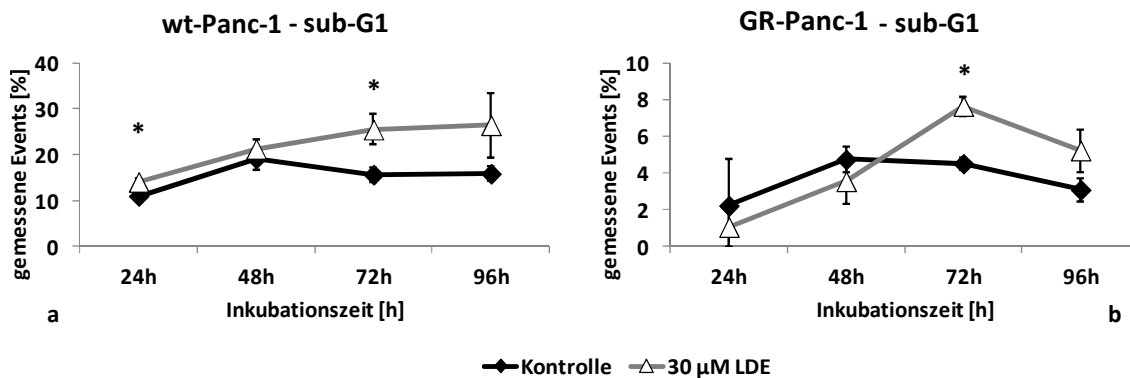


Abb. 17 (Tab. S10) FACS, subG1-Fraktion Panc-1 wt und GR. FACS-Analyse von wt-Panc-1-Zellen (a) sowie GR-Zellen (b) nach Behandlung mit 30 μ M LDE225. In wt- wie auch in GR-Zellen konnte nach 72 h eine signifikante Erhöhung der sub-G1-Fraktion gegenüber der unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden (Asterisken = $p < 0,05$).

5.2.3 LDE225-Monotherapie und Kombinationstherapie aus LDE225 und Gemcitabin

Für Capan-1-Zellen konnte kein Apoptose induzierender Effekt einer Monotherapie nachgewiesen werden. Diese Annahme war auch in Panc-1-Zellen war nicht komplett zu belegen, doch immerhin zeigte sich dort nach 72 h eine signifikante Erhöhung der sub-G1-Phase in LDE225-behandelten Zellen. In beiden Zelllinien war die GR-Variante jedoch nicht mit Gemcitabin behandelt worden. Das Apoptoseverhalten von GR-Zellen wurde deshalb in einem Folgeversuch unter Standardbedingungen mit Gemcitabin-Dauerexposition gemessen. Alle Zelllinien wurden außerdem auf das Anschlagen einer Kombinationstherapie aus Gemcitabin und LDE225 untersucht. Dies erfolgte auch in Gemcitabin-sensitiven wt-Zellen.

Schon in den Versuchen zu Proliferation war die Verdopplungszeit sowie die IC_{50} von LDE225 72 h nach Zugabe von LDE225 berechnet worden. In wt- und GR-Panc-1-Zellen war zudem nach 72 h eine erhöhte Apoptoserate festgestellt worden. Aus diesem Grund wurde für die weiterführenden Versuche zum Zellzyklus der Zeitpunkt 72 h

gewählt. Eine unbehandelte Kontrolle sowie je eine Probe mit LDE225-Monotherapie, eine Probe mit Gemcitabin-Monotherapie und eine Probe mit Kombinationstherapie aus Gemcitabin und LDE225 wurden 72 h nach Zugabe des Wirkstoffs in einer neuen FACS-Analyse untersucht. wt-Zellen in Gemcitabin-Monotherapie wurden mit 1% der in den GR-Modellen verwendeten Konzentration an Gemcitabin behandelt. Dies entsprach in wt-Capan-1 100 nM und in wt-Panc-1 10 nM Gemcitabin.

5.2.3.1 Zellzyklus in Capan-1-Zellen 72 h nach LDE225- und Gemcitabinbehandlung

Nach Kombinationstherapie mit LDE225 und Gemcitabin wiesen wt-Capan-1-Zellen keine veränderte sub-G1-Fraktion auf. Lediglich die S-Phase zeigte eine Erhöhung, was unter Gemcitabin-Monotherapie allerdings auch der Fall war. Nur dort war der beobachtete S-Phase-Arrest und die damit einhergehende Reduktion von G1-Phase-Zellen auch signifikant. Dieser Effekt ist somit nicht auf LDE225 als Bestandteil der Kombinationstherapie, sondern auf Gemcitabin zurückzuführen. Zuletzt war ein geringerer Anteil an der G2-Phase in Gemcitabin-behandelten Zellen auffällig. Diese Reduktion ist als Folge eines erhöhten S-Phase-Arrests und somit eines verminderten Progresses der Zellen in die G2-Phase zu werten (Abb. 18).

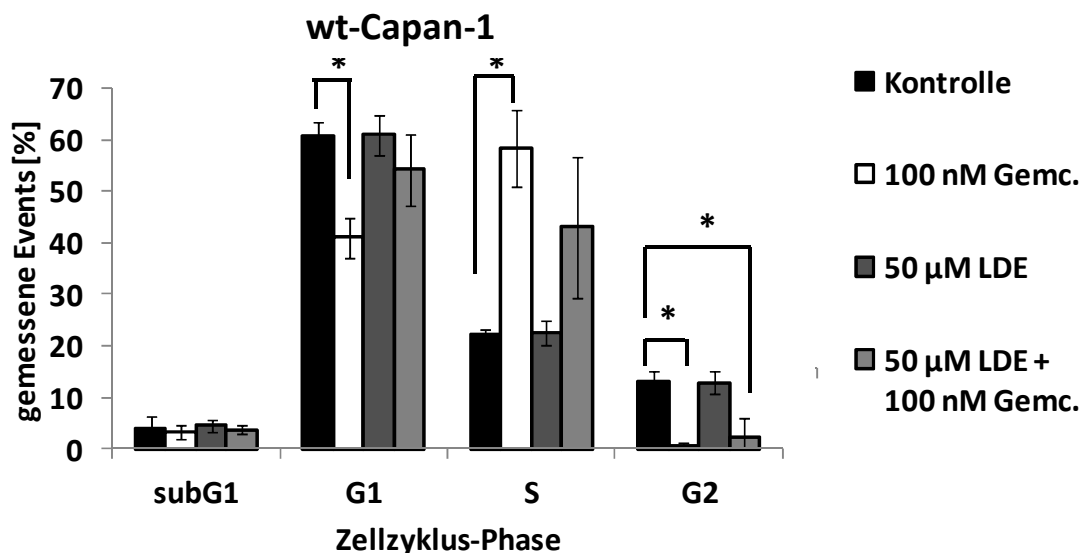


Abb. 18 (Tab. S11) FACS wt-Capan-1 bei 72h. FACS-Analyse von wt-Capan-1-Zellen 72 h nach Behandlung mit 50 µM LDE225, 100 nM Gemcitabin sowie einer Kombinationstherapie aus 50 µM LDE225 und 100 nM Gemcitabin (Asterisken = $p < 0.05$).

Auch in GR-Capan-1-Zellen war unter Kombinationstherapie gegenüber der unbehandelten Kontrolle keine signifikante Veränderung der Apoptoserate

festzustellen. Unter der Gemcitabin-Monotherapie war allerdings ein signifikant erhöhter Anteil apoptotischer Zellen zu beobachten. Dies ist jedoch nicht einer relativen Erhöhung in Gemcitabin-behandelten Zellen, sondern vielmehr einem relativen Abfall der Apoptoserate unbehandelten GR-Zellen zuzuschreiben, die zum ersten Mal ohne Gemcitabin kultiviert wurden. Die S-Phase war in der Gemcitabin-Monotherapie nicht signifikant verändert, was auf die bestehende Resistenz der GR-Variante dieser Zelllinie gegenüber Gemcitabin hinweist; die Kombinationstherapie verminderte gar den S-Phase-Anteil und verursachte dazu passend eine erhöhte G1-Fraktion. Minimale Änderungen der G2-Fraktion waren zu vernachlässigen (Abb. 19).

Insgesamt hatte LDE225 in Monotherapie keinen Einfluss auf den Zellzyklus von Capan-1-Zellen. Eine Monotherapie mit Gemcitabin bewirkte wie erwartet eine erhöhte Apoptoserate und einen S-Phase-Arrest. Anders als zuvor erwartet wurden die durch Gemcitabin verursachten Effekte wie S-Phase-Arrest oder Apoptose jedoch durch LDE225 abgemildert.

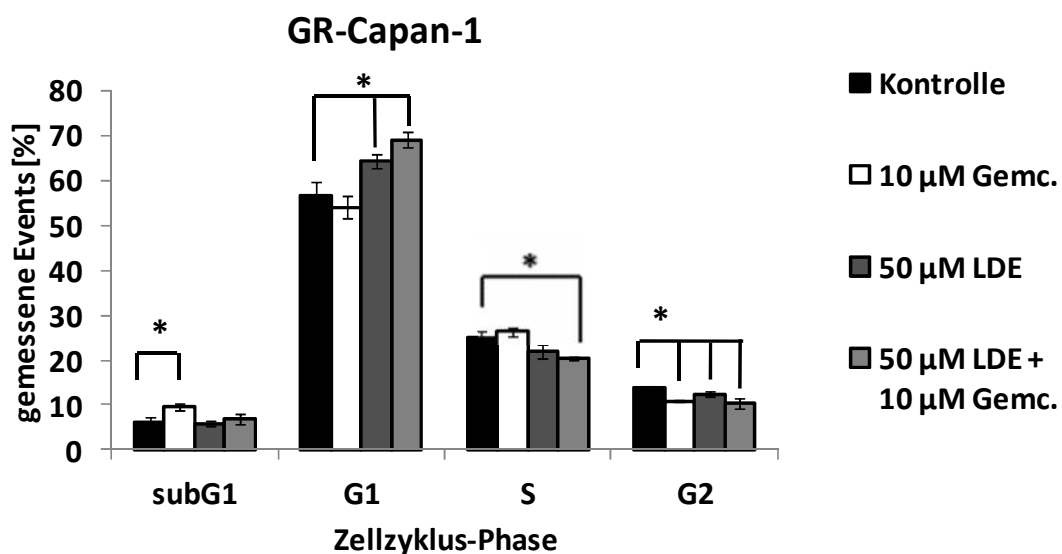


Abb. 19 (Tab. S11) FACS GR-Capan-1 bei 72h. FACS-Analyse von GR-Capan-1-Zellen 72 h nach Behandlung mit 50 µM LDE225, 10 µM Gemcitabin sowie einer Kombinationstherapie aus 50 µM LDE225 und 10 µM Gemcitabin (Asterisken = $p < 0.05$).

5.2.3.2 Zellzyklus in Panc-1-Zellen 72 h nach Behandlung mit LDE225 und Gemcitabin

Die Kombinationstherapie in wt-Panc-1-Zellen zeigte ähnliche Resultate wie schon in wt-Capan-1-Zellen: Eine Erhöhung der sub-G1-Fraktion war nicht zu beobachten, wohl aber unter Gemcitabin-Monotherapie. Auch hier fing die Koadministration von LDE225

einen von Gemcitabin verursachten antiproliferativen Effekt ab. LDE225-Monotherapie verursachte an diesem Zeitpunkt eine leichte Erhöhung der sub-G1-Fraktion, was jedoch keinen Anhalt für eine Induktion von Apoptose durch LDE225 bietet (s. Kap. 5.2.2/Abb. 17). Es zeigte sich weiterhin ein deutlicher S-Phase-Arrest in der Kombinationstherapie, der auch hier aufgrund der Anwesenheit von Gemcitabin zustande kam: Gemcitabin-Monotherapie sorgte für einen ähnlich hohen Anteil an in der S-Phase befindlichen Zellen wie die Kombinationstherapie. LDE225-Monotherapie hingegen verursachte einen geringfügig verkleinerten Anteil an S-Phase-Zellen gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 20).

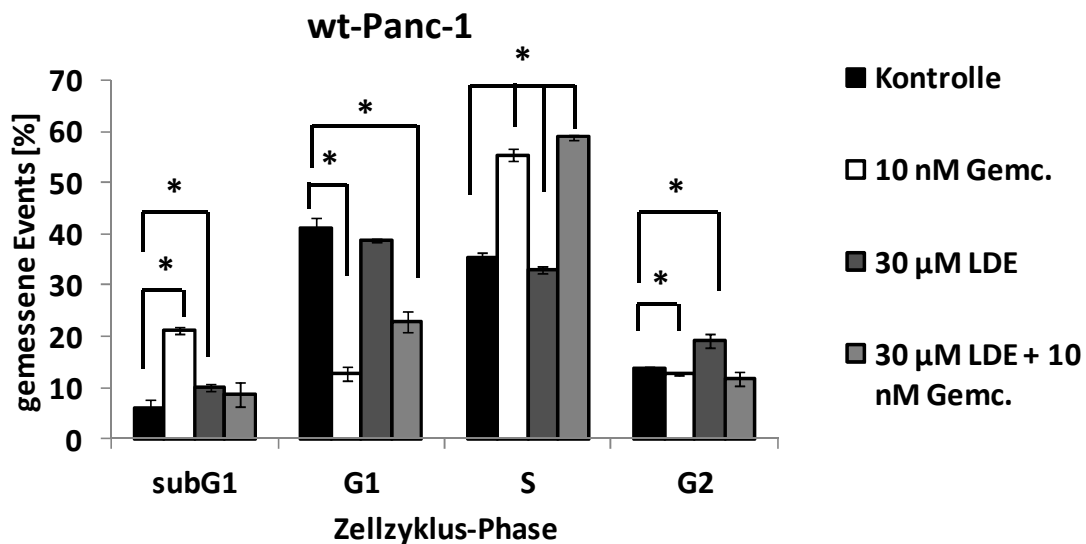


Abb. 20 (Tab. S11) FACS wt-Panc-1 bei 72h. FACS-Analyse von wt-Panc-1-Zellen 72 h nach Behandlung mit 30 µM LDE225, 10 nM Gemcitabin sowie einer Kombinationstherapie aus 30 µM LDE225 und 10 nM Gemcitabin (Asterisken = $p < 0.05$).

In GR-Panc-1-Zellen besaßen nach 72 h die Kombinationstherapie und Gemcitabin-Monotherapie denselben Anteil an apoptotischen Zellen; den höchsten Anteil apoptotischer Zellen zeigte indes die mit LDE225 monotherapierte Probe. Der Anteil der S-Phase war in beiden Gemcitabin-haltigen Proben erhöht, wobei diesmal nur die Kombinationstherapie eine signifikant erhöhte Anzahl an S-Phase-Zellen zeigte. Erwähnenswert ist außerdem die außerordentlich große G2-Fraktion, die auch in der unbehandelten Kontrolle sowie in der Gemcitabin-monotherapierten Probe zu sehen war. Die Erhöhung von G2-Zellen ist als Zellzyklusarrest interpretierbar und möglicherweise eine Ursache der hohen Verdopplungszeit von GR-Panc-1-Zellen (Abb. 21).

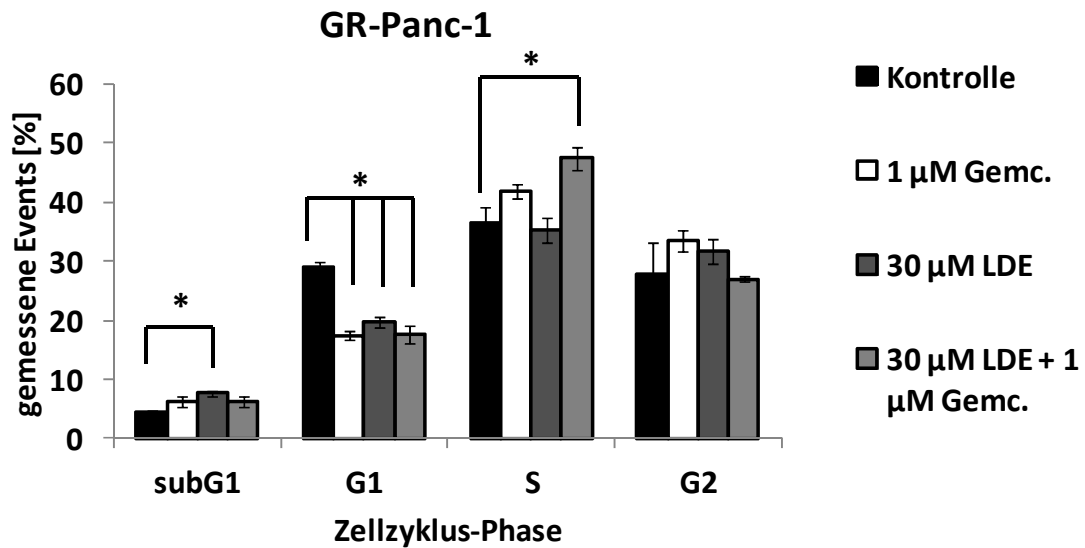


Abb. 21 (Tab. S11) FACS GR-Panc-1 bei 72h. FACS-Analyse von GR-Panc-1-Zellen 72 h nach Behandlung mit 30 µM LDE225, 1 µM Gemcitabin sowie einer Kombinationstherapie aus 30 µM LDE225 und 1 µM Gemcitabin (Asterisken = $p < 0.05$).

Interessanterweise fiel im GR-Modell der Anteil apoptotischer Zellen innerhalb der LDE225-mono-Probe am höchsten aus. Wegen dieser Unregelmäßigkeit im Vergleich zu den anderen Zelllinien wurde hier die Messung der GR-Zellen unter Kombinationstherapie für alle vier Beobachtungszeitpunkte durchgeführt, um zu zeigen, dass die Apoptoserate unter Monotherapie mit LDE225 nicht an mehreren Zeitpunkten über der Rate bei Kombinationstherapie lag. Tatsächlich besaßen LDE225-behandelte Zellen nur nach 72 h den höchsten sub-G1-Anteil, während an den übrigen Intervallen (24, 48 und 96 h) die Kombinationstherapie führend war. Ein signifikanter Unterschied zwischen der alleinigen Behandlung mit LDE225 und der Kombinationstherapie von GR-Zellen war jedoch zu keinem Zeitpunkt zu beobachten, was die Arbeitshypothese bestärkt, dass LDE225 keinen additiven Effekt auf Gemcitabin ausübt (Abb. 22).

Nach Durchführung dieser Versuche konnte somit festgestellt werden, dass LDE225 auch in Panc-1-Zellen einen, wenn überhaupt, nur geringen Einfluss auf die Apoptose hat. Auch hier war die Applikation von Gemcitabin deutlich wirksamer. Der abgeschwächte Effekt von Gemcitabin in der Kombinationstherapie verglichen mit der Monotherapie ist eine Auffälligkeit dieser Versuchsreihe, auf die in der Diskussion noch eingegangen werden wird.

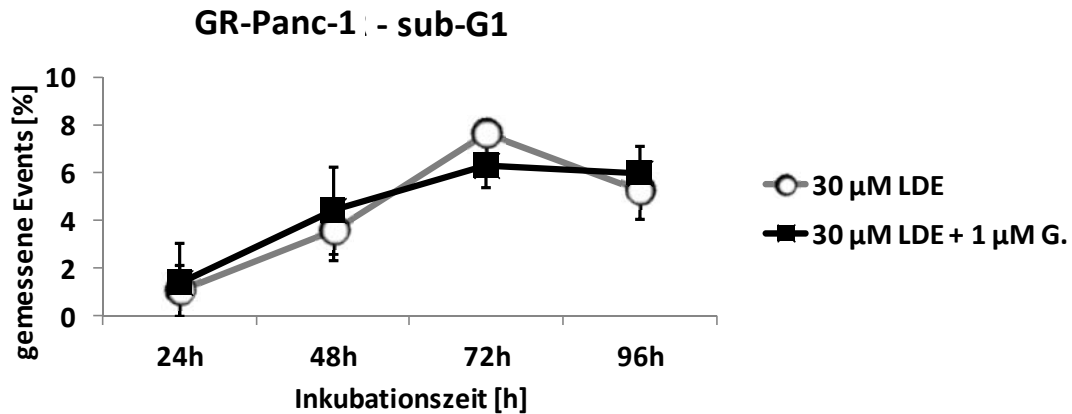


Abb. 22 (Tab. S12) FACS GR-Panc-1, Mono- vs. Kombinationstherapie. FACS-Analyse von GR-Panc-1-Zellen nach Monotherapie LDE225 und nach Koadministration von LDE225 und Gemcitabin. Es konnte keine signifikante Veränderung der sub-G1-Fraktion in der Kombinationstherapie gegenüber LDE225-Mono nachgewiesen werden.

5.3 Baseline-Genexpression des Shh-Signalwegs ohne Behandlung mit LDE225

Bei den GR-Pendants beider Zelllinien war sowohl das Proliferationsverhalten als auch das Ansprechen auf den SMO-Inhibitor LDE225 anders als in den wt-Ursprungszellen. Mittlerweile ist bekannt, dass ein aktivierter Shh-Signalweg ein essentieller Bestandteil von pankreatischen Tumorzellen ist (Berman et al., 2003). Um zu untersuchen, welche Änderungen in der Aktivität und Ausstattung des Shh-Signalwegs mit dem unterschiedlichen Proliferationsverhalten von wt- und GR-Zellen einhergingen, wurde eine quantitative Analyse der Genexpression des Shh-Signalwegs durchgeführt. Der Vergleich von GR-Zellen mit ihren wt-Geschwistern erbrachte einige Auffälligkeiten der Expressionsmuster der vier Shh-Hauptkomponenten *SMO*, *PTCH*, *GLI* und *SHH*. Die Genexpression von unbehandelten Zellen wird im folgenden *Baseline-Expression* genannt.

5.3.1 Charakterisierung der Baseline-Expression in Capan-1- und Panc-1-Zellen

In den GR-Pendants beider Zelllinien wurde ein völlig anderes Aktivierungsmuster des Shh-Signalwegs offenbar als in wt-Zellen. *PTCH1*, welches ein Zielgen von *GLI1* ist und mithin einen Aktivitätsmarker des Hh-Signalwegs darstellt, war in GR-Capan-1 herunterreguliert. In GR-Panc-1 war bei *PTCH1* eine geringfügige, jedoch nicht signifikante Erhöhung zu beobachten. *GLI1* war in sowohl in GR-Capan-1 als auch in GR-Panc-1 deutlich vermindert und zeigte somit einen reduzierten Aktivitätsgrad des

Hh-Signalwegs in beiden Zelllinien an. *SMO* war in GR-Capan-1 deutlich hochreguliert, während sich in GR-Panc-1 eine ebenso starke Abwärtsregulation zeigte. *SHH* war in GR-Capan-1 drastisch herunterreguliert, in GR-Panc-1 hingegen deutlich erhöht (Abb. 23).

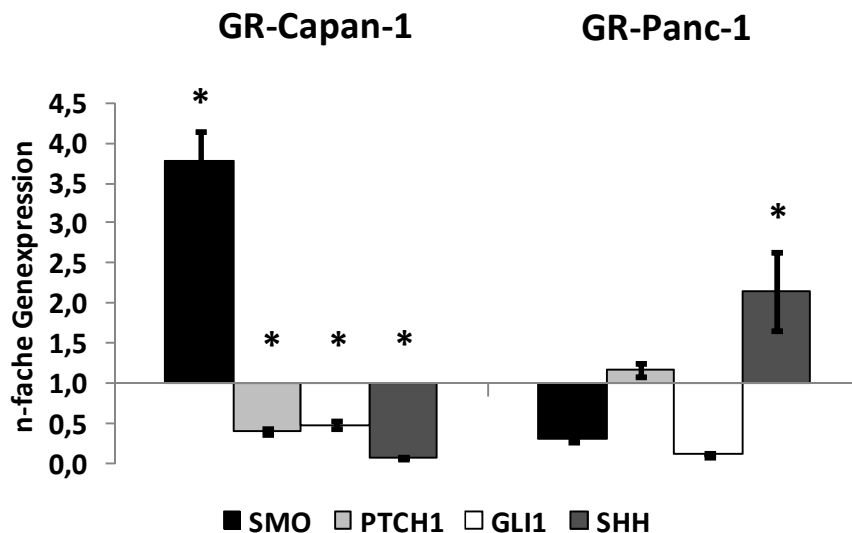


Abb. 23 (Tab. S13) qPCR Capan-1 und Panc-1, Baseline-Genexpression. rt-qPCR-Analyse der Genexpression der vier Hauptkomponenten des Shh-Signalwegs von Capan-1- und Panc-1-Zellen. Die Expression von wt-Zellen war der Vergleichsstandard und wurde als 1 definiert. Die Balken stehen für die quantitative Expression der Gene in GR-Zellen, die in Relation zur Expression in wt-Ursprungszellen gesetzt sind (Asterisken = $p < 0,05$). In GR-Capan-1-Zellen beispielsweise ist die Expression von *SMO* ca. 3,8-mal so hoch wie in wt-Zellen. In GR-Panc-1-Zellen hingegen beträgt die Expression im Vergleich mit wt-Zellen nur ca. 30%.

5.3.2 Assoziation der Baseline-Expression von *SMO* mit der IC_{50} von LDE225

In GR-Capan-1-Zellen war die Baseline-Expression von *SMO* gegenüber wt-Zellen um den Faktor 3,8 erhöht. Ein hierzu beinahe inverses Verhältnis fand sich in GR-Panc-1-Zellen, wo die *SMO*-Baseline-Expression nur das 0,3-fache der Expression in wt-Zellen betrug. Auffallend ist die Assoziation dieser Werte mit der veränderten IC_{50} von LDE225 in den GR-Pendants beider Zelllinien: Diese war in GR-Capan-1 um den Faktor 1,34 erhöht (58 μ M in GR vs. 43 μ M in wt), betrug in GR-Panc-1 jedoch nur 26% des in wt-Zellen gemessenen Werts (7,6 μ M vs. 29 μ M).

5.3.3 Zellwachstum und Aktivität des Hedgehog-Signalwegs

Der Hh-Aktivierungsgrad in GR-Capan-1- sowie GR-Panc-1-Zellen gegenüber ihren wt-Ursprungszellen war anhand der gemessenen *GLI1*- und *PTCH1*-Baseline-Expression

deutlich vermindert (relative *GLI1*-Expression in GR-Capan-1 Zellen 48%, in GR-Panc-1-Zellen 11%, Tab. S13). Es war in beiden GR-Varianten außerdem eine höhere Verdopplungszeit gemessen worden (s. Kap. 5.1, Tab. 15). Das in GR-Zellen nachgewiesene langsamere Wachstum sowie die niedrigere Hh-Aktivität untermauern die Hypothese, dass das Pankreaskarzinom zum raschen Wachstum auf einen aktivierten Hh-Signalweg angewiesen ist (s. Kap. 6.4).

5.4 qPCR-Analyse des Shh-Signalwegs nach Behandlung mit LDE225

Bei beiden Zelllinien legten die wt- wie auch die GR-Varianten nach Behandlung mit LDE225 keinen deutlich veränderten Aufbau des Zellzyklus an den Tag und zeigten auch keine anhaltende Änderung der Apoptoserate. In der Analyse der Baseline-Genexpression zeigte sich, dass die SMO-Expression mit der IC_{50} assoziiert war und dass das verminderte Wachstum von GR-Zellen mit einer Reduzierung der Hh-Aktivität einherging. Der nächste Schritt bestand nun in der Untersuchung, inwiefern die Behandlung mit LDE225 Einfluss auf die Aktivität des Hh-Signalwegs hatte und mit welchen Gegenregulationen die Zelllinien auf die SMO-Inhibition antworteten. Hierzu wurde wieder eine quantitative Analyse der Expression der Shh-Gene *SMO*, *PTCH*, *GLI* und *SHH* durchgeführt.

Von jeder Zelllinie wurde wt- und GR-Zellen mit derselben Konzentration an LDE225 behandelt, um die beobachteten Effekte in der Genexpression direkt miteinander zu vergleichen (50 μ M LDE225 in Capan-1-Zellen und 30 μ M LDE225 in Panc-1-Zellen). GR-Zellen wurden wie schon in der Zellkultur weiterhin mit der entsprechenden Konzentration an Gemcitabin versehen (10 μ M in Capan-1 und 1 μ M in Panc-1). Um Tendenzen in der Genexpression nach Behandlung mit LDE225 klarer erkennen beschreiben zu können, wurde bei 24, 48, 72 und 96 h nach Zugabe von LDE225 die zur unbehandelten Kontrolle relative Genexpression bestimmt.

5.4.1 Genexpression in LDE225-behandelten wt-und GR-Capan-1-Zellen

In wt-Capan-1-Zellen verminderte sich im Beobachtungszeitraum die Expression von *PTCH1* kontinuierlich. Passend hierzu war ein dauerhaft reduzierter Anteil von *GLI1* zu beobachten. Die Analyse ergab außerdem eine stark erhöhte Expression von *SMO*, die

besonders im Zeitraum von 48 bis 96 h zu beobachten war. *SHH* wurde im Laufe der 96 h deutlich herabreguliert (Abb. 24).

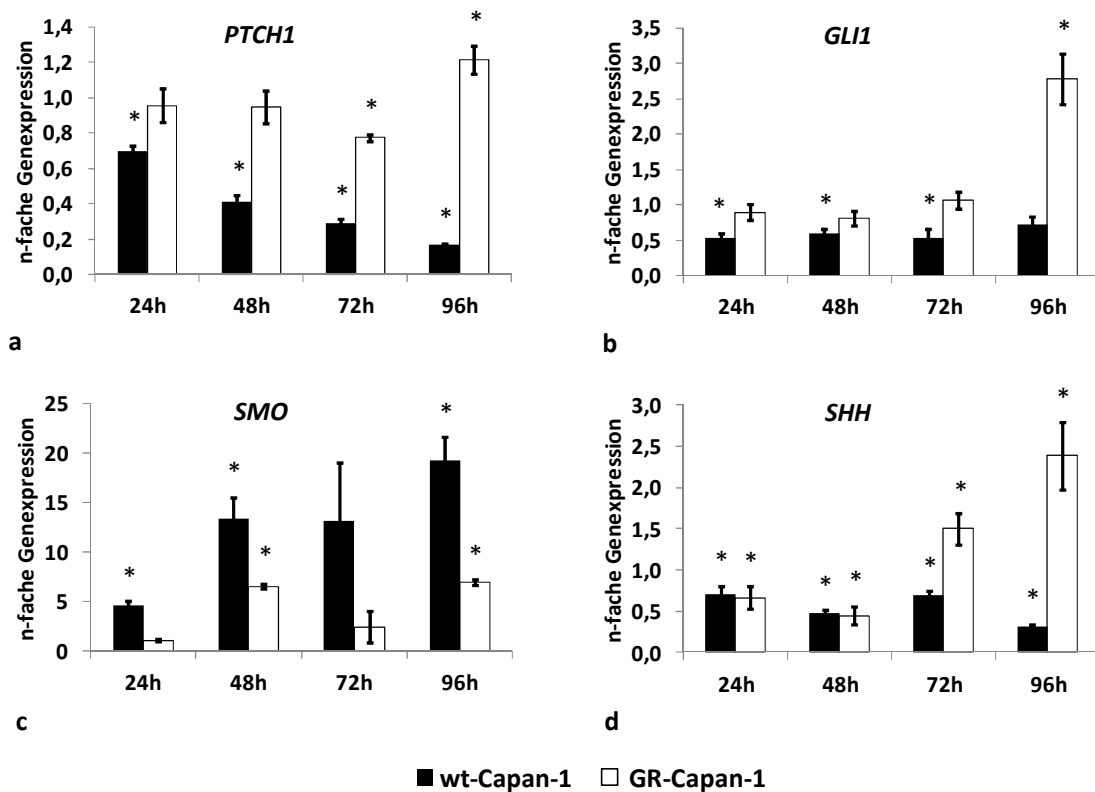


Abb. 24 (Tab. S14-16) qPCR Capan-1 wt und GR, Genexpression bei 24 – 96 h. qPCR-Analyse von Capan-1 Zellen nach Behandlung mit 50µM LDE225. Dargestellt ist die n-fache Expression der Gene *PTCH* (a), *GLI1* (b), *SMO* (c) und *SHH* (d) behandelter Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle über einen Zeitraum von 96 h. Die Expression der unbehandelten Kontrolle wurde als 1 definiert und ist nicht dargestellt. Auf der X-Achse ist die Inkubationszeit [h] aufgetragen (Asterisken = $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle).

Anders als in ihren wt-Geschwistern veränderte sich in den GR-Zellen die Expression von *PTCH1* nicht nennenswert und lag dauerhaft im Bereich um den Ausgangswert; lediglich bei 96 h war eine leichte Erhöhung des mRNA-Levels auszumachen. In ähnlicher Weise verhielt sich auch die Expression von *GLI1*: Bis 72 h nach Zugabe von LDE225 bewegten sich die Werte nahe dem Ausgangswert, bei 96 h gab es hier jedoch einen deutlichen Anstieg. Wie in den wt-Zellen zeigte *SMO* nach 48 und 96 h eine signifikant gesteigerte Expression, die in den GR-Zellen jedoch ein geringeres Ausmaß hatte. *SHH* erfuhr nach einer initialen Verminderung bei 24 und 48 h eine Steigerung bei 72 und 96 h (Abb. 24).

5.4.2 Genexpression in LDE225-behandelten wt-und GR-Panc-1-Zellen

wt-Panc-1-Zellen reagierten auf die Behandlung mit LDE225 mit einer insgesamt verminderten Expression von *PTCH1*, obwohl sich bei 48 und 72 h der Wert nicht signifikant vom Ausgangswert unterschied. Ähnlich verhielt es sich bei *GLI1*, welches 24 bis 72 h nach Behandlung kaum von der 1-fachen Expression abwich und erst nach 96 h eine Abwärtsregulation zeigte, die jedoch nicht signifikant war. Im zeitlichen Verlauf gesehen verringerten sich diese beiden Parameter also. Die Expression von *SMO* nahm, mit einer Ausnahme bei 72 h, konstant ab. Eine noch deutlichere Suppression war bei *SHH* an allen Intervallen zu beobachten.

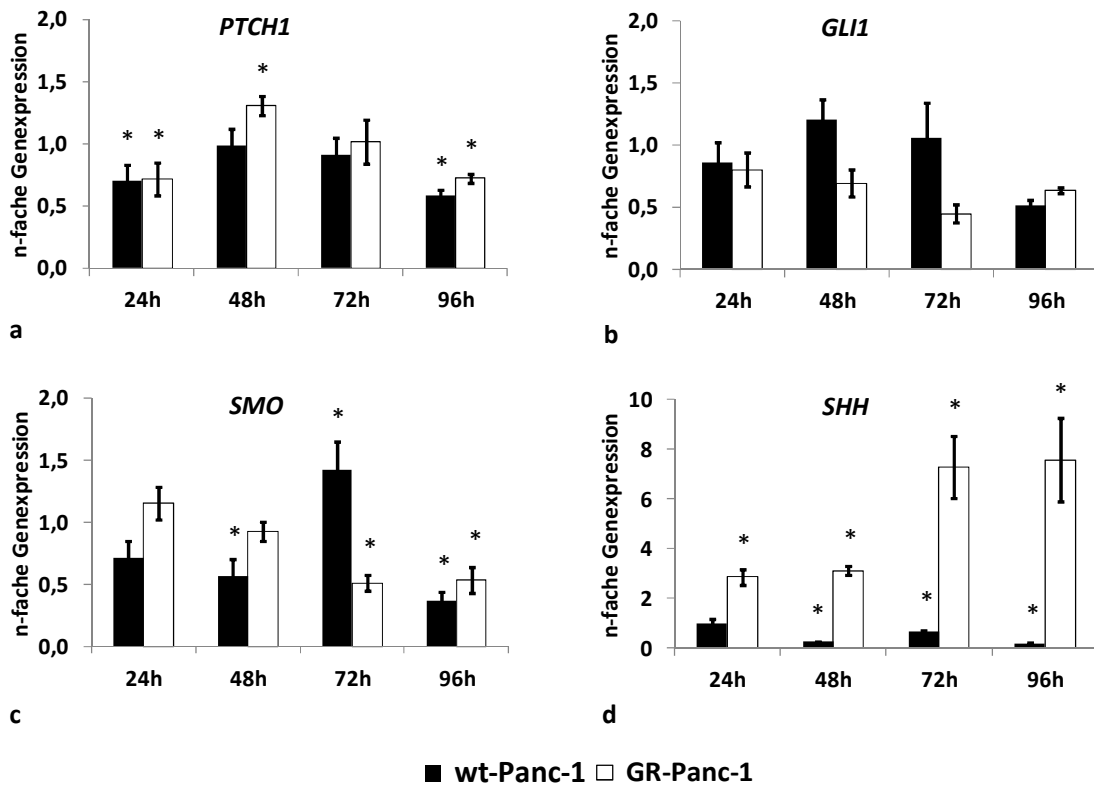


Abb. 25 (Tab. S17 - 19) qPCR Panc-1 wt und GR, Genexpression bei 24 – 96 h. qPCR-Analyse von Panc-1 Zellen nach Behandlung mit 30µM LDE225. Dargestellt ist die n-fache Expression der Gene *PTCH* (a), *GLI1* (b), *SMO* (c) und *SHH* (d) behandelter Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle über einen Zeitraum von 96 h. Die Expression der unbehandelten Kontrolle wurde als 1 definiert und ist nicht dargestellt. Auf der X-Achse ist die Inkubationszeit [h] aufgetragen (Asterisken = $p < 0,05$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle).

Hinsichtlich *PTCH1* und *GLI1* wurde in der GR-Variante eine ähnliche Tendenz beobachtet wie in wt-Zellen: Aufgrund der signifikant verminderten Expression nach 24 und 96 h von *PTCH1* ist hier eine geringe Suppression zu konstatieren, doch lag nach 48 h die Expression einmalig über dem Wert der unbehandelten Kontrolle. Bei den *GLI1*-Levels zeigte sich erst zu den späteren Zeitpunkten eine Reduktion. Die

Expression von *SMO* war ab dem Zeitpunkt 72 h signifikant kleiner als die 1-fache Expression der unbehandelten Kontrolle und zeigte insgesamt eine stetige Abwärtsentwicklung. Die Expression von *SHH* wuchs im Verlauf stark an (Abb. 25).

5.4.3 Verlauf der Hh-Aktivität nach Behandlung mit LDE225

In wt-Capan-1-Zellen zeigte sich anhand geringerer *GLI1*- und *PTCH1*-Bestände eine dauerhaft verminderte Hh-Aktivität. In GR-Zellen konnte dieselbe Konzentration von LDE225 diesen Effekt jedoch nicht hervorrufen, und zu den meisten Beobachtungszeitpunkten gab es keine nennenswerte Veränderung in der Hh-Aktivität; passend hierzu ist, wie in den Versuchen zur Proliferation beobachtet, die erhöhte Toleranz von GR-Capan-1-Zellen gegenüber LDE225.

In der Zelllinie Panc-1 war in wt- und GR-Zellen die Expression von *GLI1* und *PTCH1* vermindert und somit auch die Aktivität des Hh-Signalwegs reduziert. Während der Behandlung mit LDE225 zeigten GR-Panc-1-Zellen insgesamt eine deutlich stärkere Suppression von *GLI1*.

5.5 Western Blot-Analyse der Expression von GLI1

In den Versuchen zur Genexpression wurde eine Reduktion der Aktivität des Shh-Signalwegs nach Behandlung mit LDE225 beschrieben. Um zu verifizieren, inwiefern auch auf Proteinebene eine Veränderung der *GLI1*-Expression festzustellen war, wurde eine Western Blot-Analyse LDE225-behandelter Proben durchgeführt. Hierzu wurde, wie schon zuvor, Die Zelllinie Capan-1 mit 50 μ M LDE225 behandelt und Panc-1 mit 30 μ M LDE225. GR-Capan-1-Zellen erhielten zusätzlich 10 μ M Gemcitabin, GR-Panc-1-Zellen 1 μ M Gemcitabin. Neben einer unbehandelten Kontrolle wurde an den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 h die Proteinexpression bestimmt und quantifiziert, um einen zeitlichen Verlauf der Expression zu dokumentieren.

5.5.1 *GLI1*-Expression nach Behandlung mit 50 μ M LDE225 in Capan-1-Zellen

Vierundzwanzig Stunden nach Behandlung mit LDE225 stieg der *GLI1*-Gehalt in wt-Capan-1-Zellen auf über das doppelte gegenüber dem Ursprungswert. Dieser überschießenden Reaktion folgte eine stetige Reduzierung der *GLI1*-Bestände: Nach 48

und 72 h näherte sich die Expression bereits wieder dem Ausgangswert an. GLI1 sank 96 h nach Zugabe gar auf einen deutlich niedrigeren Stand als in der unbehandelten Kontrolle. Insgesamt lässt sich für die Zelllinie wt-Capan-1 also festhalten, dass einer initialen Erhöhung von GLI1 ein stetiger Abfall folgt.

GR-Zellen reagierten auf die Behandlung mit LDE225 ähnlich wie ihre wt-Geschwisterzellen. Es wurde 24 h nach der Behandlung ein mehr als doppelt so hoher GLI1-Gehalt als noch in der unbehandelten Kontrolle gemessen. Nach 48 und 72 h sank dieser auch hier auf ein mit dem Ausgangswert vergleichbares Level ab und befand sich nach 96 h schlussendlich bei einem geringeren Stand als in der unbehandelten Kontrolle.

In beiden Varianten wurde nach Behandlung mit derselben Dosis LDE225 also eine initiale Hochregulation der Expression von GLI1-Protein festgestellt, auf die eine stetige Reduktion der GLI1-Bestände folgte (Abb. 26).

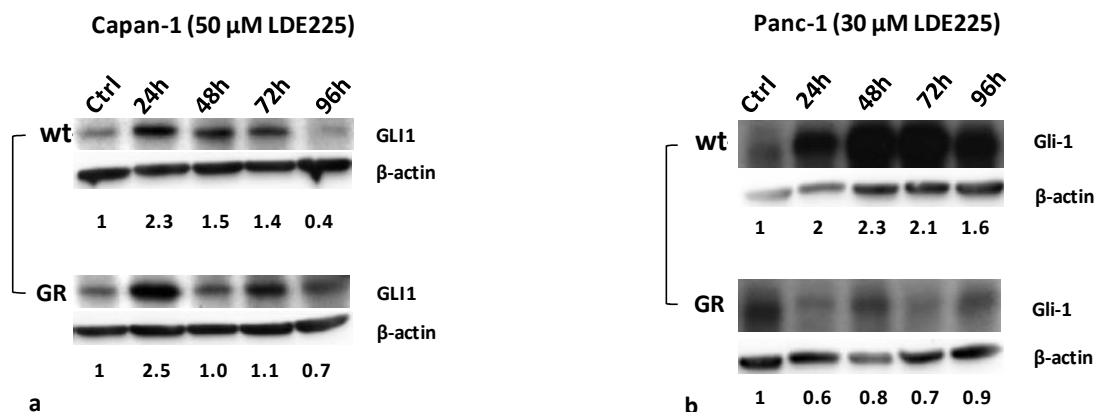


Abb. 26 Western Blot Capan-1 und Panc-1, Proteinexpression bei 24–96 h. Western Blot Analyse des Hh-Effektorproteins GLI1 von Capan-1- (a) sowie Panc-1-Zellen (b). Um die Aktivität des Hh-Signalwegs nach der Behandlung mit LDE225 zu untersuchen, wurden die GLI1-Proteinbanden quantifiziert und zur unbehandelten Kontrolle (Ctrl) sowie den β-actin-Banden normalisiert

5.5.2 GLI1-Expression nach Behandlung mit 30 µM LDE225 in Panc-1-Zellen

In Panc-1 wt-Zellen war 24 h nach Zugabe von LDE225 eine ähnlich starke Erhöhung der GLI1-Expression festzustellen. Anders als in Capan-1-Zellen stieg die Expression jedoch erst nach 48 h auf ihren Höchstwert und war auch 72 h nach Zugabe des SMO-Inhibitors noch gegenüber dem 24 h-Wert erhöht. Ein relativer Abfall zeigte sich erst nach 96 h, doch auch dann waren die Bestände noch deutlich über denen der

unbehandelten Kontrolle. Insgesamt war in wt-Zellen also eine Erhöhung des GLI1-Gehalts zu beobachten, die anders als in Capan-1-Zellen kaum reversibel war.

In der GR-Variante bewirkte die Behandlung mit LDE225 eine sofortige Reduktion von GLI1 bereits nach 24 h. Im weiteren Verlauf näherte sich die Expression sukzessive wieder dem Ausgangswert an, den sie nach 96 h fast erreichte.

In Panc-1 wt- und GR-Zellen zeigte sich somit eine heterogene Antwort der GLI1-Expression auf die Behandlung mit dem SMO-Inhibitor LDE225: Während wt-Zellen mit einer Erhöhung reagierten, reduzierte sich der Gehalt in der GR-Variante vor Allem in den früheren Beobachtungszeitpunkten. Insgesamt waren die Veränderungen in allen vier Zelllinien eher vorübergehender Natur, da nach einigen Tagen stets eine Gegenregulation der GLI1-Expression einsetzte (Abb. 26).

6. Diskussion

Die vorliegende Arbeit liefert neue Erkenntnisse über die Effekte von LDE225, einen der neuesten SMO-Inhibitoren, auf pankreatische Tumorzellen. Es wurden Zellen mit erworbener Resistenz gegen Gemcitabin zusammen mit ihren sensitiven Ursprungszellen betrachtet und ihr Ansprechen auf eine Therapie mit LDE225 untersucht. Der Vergleich der *in vitro*-Effekte einer Therapie mit LDE225 vom wildtyp sowie von Gemcitabin-resistenten Zellen liefert Erkenntnisse über die Funktion des Hh-Signalwegs und Abweichungen nach erworbener Gemcitabinresistenz.

Es wurde, wie schon zuvor bei anderen niedermolekularen SMO-Inhibitoren, eine messbare Inhibition auf die Proliferation etablierter PDAC-Zelllinien unter LDE225 nachgewiesen und die effektiven Konzentrationen in den einzelnen Zelllinien bestimmt. So zeigten sich hinsichtlich des Ansprechens individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien, die maßgeblich durch die erworbene Gemcitabinresistenz beeinflusst wurde.

Die Analyse der Apoptose und Genexpression des Hh-Signalwegs nach Behandlung mit LDE225 lieferte Hinweise, inwiefern die Substanz Einfluss auf das Wachstum von isolierten Tumorzellen nehmen könnte. Diese Daten sind insofern von Bedeutung, als dass in der experimentellen Forschung zu therapeutischen Effekten von SMO-Inhibitoren im PDAC das Augenmerk bislang auf dem Tumorstroma, Tumor-Stroma-Interaktionen und Krebsstammzellen sowie auf Überlebensparametern wie Tumorgroße, Überlebensdauer oder Metastasen lag. Durch die explizite Fokussierung auf Tumorzellen widmet sich vorliegende Arbeit einem bislang eher weniger beachteten Feld und bearbeitet die Frage, inwieweit dieser Signalweg in den Krebszellen selbst therapeutisch nutzbar ist, da ihm bei Tumorgenese und Erwerb von Chemoresistenz eine wichtige Rolle zugesprochen wird.

Zuletzt wurde das Ansprechen der Zellen auf LDE225 mit der Expression relevanter Signalwegskomponenten verglichen, um potentielle prädiktive Faktoren für die Therapie mit SMO-Inhibitoren zu ermitteln.

6.1 Zu den Methoden der Arbeit

6.1.1 Versuche zu Proliferation und Wachstum

Das xCELLigence RTCA System stellt ein neues Verfahren zum permanenten und nichtinvasiven Monitoring kultivierter adhärenter Zellen dar. Dank der dauerhaften Überwachung kann das Eintreten eines messbaren Effekts einer Substanz genau eingegrenzt sowie quantifiziert werden. Es wurde bereits gezeigt, dass die Daten aus xCELLigence-Versuchen vergleichbar sind mit denen aus etablierten Endzeitpunkt-Assays und die als CI gemessene Zellzahl den lebensfähigen Zellen aus diesen Assays entspricht (Ke et al., 2011). Der CI-Wert kommt dabei in etwa durch folgenden Ablauf zustande: Neu ausgesäte Zellen sinken zunächst zum Boden der Wells ab. Dort brauchen sie Stunden, um anzuhafte. Das Anhaften ist dabei ein kontinuierlicher Prozess, bei dem sich die Auflagefläche der Zellen stetig vergrößert. Auch wenn die Zellen durch Wachstum im Umfang zunehmen, erhöht sich der CI (Atienza et al., 2005). Doch die beobachtete exponentielle Zunahme des CI kommt erst zustande, wenn die Zellen aktiv proliferieren und den Boden der Wells somit peu à peu „besiedeln“ (Atienza et al., 2005).

Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, haben wir in parallelen Versuchen das Ansprechen der Zellen auf LDE225 mittels manueller Zellzählung bestätigt. Das xCELLigence System kann nämlich Zellen, die mehrschichtig wachsen oder sich ablösen, nicht erfassen, da sie keine Impedanzänderung auf den Goldelektroden verursachen. Dies wurde bereits an Keratinozyten nachgewiesen, die wegen dieser morphologischen Charakteristika keinen CI erzeugen, der mit ihrer Proliferationsrate konsistent ist (Vistejnova et al., 2009). Die verwendeten Zelllinien zeigten aber ein reguläres adhärentes Wachstumsmuster, und die Wachstumskinetik im xCELLigence entsprach den Daten der Zellzählung. Es konnte somit eine gute Übereinstimmung der Daten beider Verfahren bestätigt werden.

6.1.2 Versuche zu Zellzyklus und Apoptose

Die Zelllinie Capan-1 entstammt ursprünglich einem gut differenzierten G1-Tumor, während Panc-1 aus einem schlecht differenzierten G3-Tumor isoliert wurde (Sipos et al., 2003). Eine technische Schwierigkeit bestand in unseren Versuchen in der Analyse

von wt-Panc-1-Zellen, die ein dreigipfliges Histogramm aufwiesen. Die Zelllinie Panc-1 wurde bei ihrer Entdeckung als aneuploid beschrieben (Lieber et al., 1975). Laut ATCC (American Type Culture Collection) besitzen 32% der Panc-1-Zellen 61 Chromosomen, und aufgrund des Selektionsdrucks unter Zellkultur können weitere Anomalien auftreten. Bekannt ist in Panc-1-Zellen eine Vermehrung der Chromosomen 1 und 17 (Verdoodt et al., 1997). In der Zelllinie ist die Überexpression von *STK15* bekannt, einem Gen, das Veränderungen an den Zentrosomen der Chromosomen verursacht und somit Aberrationen verursacht (Li et al., 2003). Von dem dreigipfligen Histogramm werteten wir nun den zweiten und dritten Gipfel als die G1- und G2-Ereignisse der „regulären“ Chromosomen. Der erste Gipfel war deutlich kleiner und in der Auswertung durch die Software nicht gesondert zu erfassen oder heraus zu rechnen. Deshalb wurde er in den Bereich der als Apoptose gewerteten sub-G1-Ereignisse mit aufgenommen. Dadurch war der Anteil von sub-G1-Ereignissen in den allen Proben insgesamt etwas höher als in den anderen Zelllinien. Die Proben zeigten hinsichtlich ihrer sub-G1-Fraktionen je nach Behandlung dennoch teils signifikante Unterschiede (s. Kap. 5.3.2), was auf die übrigen sub-G1-Ereignisse außerhalb des ersten Gipfels zurückzuführen ist. Aufgrund dieser Unterschiede war eine Interpretation der Daten möglich, doch sollten die Ergebnisse immer relativ zu den Kontrollen betrachtet werden. GR-Panc-1-Zellen zeigten interessanterweise ein zweigipfliges Histogramm, in dem von dem irregulären Gipfel aus der wt-Zelllinie keine Spur zu sehen war. Panc-1-Zellen wurden ab der 10. Passage zur Adaptation mit Gemcitabin behandelt und erreichten eine Resistenz gegen 1 μ M Gemcitabin während der 30. Passage. Somit unterlagen sie über 20 Passagen einem anderen Selektionsdruck. Dies kann die unterschiedlichen Histogramme erklären. Um diesem Phänomen Rechnung zu tragen, wurden GR-Zellen als komplett eigenständige Zelllinie betrachtet. Genomische Untersuchungen (array comparative genomic hybridization, aCGH) zeigen, dass Panc-1 eine genomisch instabile Zelllinie ist (Legoffic et al., 2009). Aufgrund dieser Tatsache akkumulieren im Laufe der Passagierung Mutationen und lassen die ursprünglich gleiche wt- und GR-Zelllinie genomisch auseinanderdriften. Wenn auch die genetische Ausstattung dieser beiden Zelllinien voneinander abweicht, so waren die führenden und uns interessierenden Phänomene der GR-Panc-1 Linie die Gemcitabinresistenz und die Wirkung von LDE225, weshalb die Zelllinie für unsere Versuche gut geeignet war.

6.1.3 Western Blot-Analyse der GLI1-Proteinexpression

In der Literatur wird die Expression von *GLI1*-mRNA als primärer Parameter zur Bestimmung der funktionalen Aktivität des Hh-Signalwegs angegeben (Lauth, 2012) und in beinahe jeder Publikation zum PDAC wird der Parameter in dieser Hinsicht verwendet. Zur genauen Beschreibung des Hh-Signalwegs haben wir zusätzlich die Expression des Genprodukts und Proteins GLI1 untersucht, da dieses der eigentliche Akteur am Ende der Hh-Signalkaskade ist (Ingham and McMahon, 2001). Die Proteinexpression bietet somit einen zusätzlichen Anhaltspunkt für die Interpretation der zellulären Antwort auf Behandlung mit LDE225. Dieser unterliegt jedoch zwei Einschränkungen: Erstens untersuchten wir den gesamten zellulären Gehalt an GLI1, während aktiviertes GLI1 nur im Zellkern vorzufinden ist, während inaktiviertes GLI1 im Zytosol gebunden und sequestriert ist (Merchant et al., 2004). Zweitens korreliert die Proteinexpression sowohl quantitativ als auch qualitativ nicht zwangsläufig mit dem Bestand an mRNA des entsprechenden Gens (Nelson and Keller, 2007). Zur Korrelation der Expressionsniveaus von *GLI1*-mRNA und GLI1-Protein sind in der Literatur noch keine Daten vorzufinden. Unsere Versuche zeigen bei einigen Zelllinien, dass Hoch- oder Herunterregulation der mRNA von gleich gerichteten Änderungen der Proteinmenge begleitet wird. Dennoch sollte diese Methodik aufgrund weiterer bekannter und unbekannter Regulationsmechanismen der GLI1-Expression differenziert betrachtet werden.

6.2 Der proliferationshemmende Effekt von LDE225 in Capan-1- und Panc-1-Zellen

6.2.1 Analyse des Proliferationsverhaltens anhand der IC₅₀

Proliferationshemmende Effekte von LDE225 wurden bereits in Medulloblastom-Zelllinien (Buonamici et al., 2010) und in hämatologischen Tumorzelllinien beschrieben (Blotta et al., 2012; Decker et al., 2012). Weiterhin ist ein deutlicher Effekt der Substanz bei Inselzelltumoren in einem *in vivo*-Mausmodell beschrieben (Fendrich et al., 2011). Für LDE225 gibt es in PDAC-Zelllinien noch keine vergleichbaren Daten, doch wurden mit anderen SMO-Inhibitoren in Pankreaskarzinom-Zelllinien bereits in Endzeitpunkt-Versuchen antiproliferative Effekte gezeigt. Der Dosisbereich lag auch hier im μM -Bereich. In prominenten und viel beachteten Versuchsreihen arbeitete

man mit Cyclopamin, Vismodegib (GDC-0449) und Saridegib (IPI-926) (Feldmann et al., 2007; Strand et al., 2011). Der Effekt von SMO-Inhibitoren auf die Zelllinien Capan-1 und Panc-1 wurde in verschiedenen Arbeiten behandelt. In Capan-1-Zellen wurden halbmaximale Konzentrationen von unter 10 μM für IPI-609 (Feldmann et al., 2008a) sowie zwischen 5 und 20 μM für Cyclopamin und den neueren Wirkstoff Hh-Antag festgestellt (Bahra et al., 2012). Ähnlich hohe IC_{50} wurden für HH-Antag in verschiedenen epithelialen Tumorzelllinien, darunter auch pankreatische Zelllinien, gefunden (Yauch et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit sind die errechneten IC_{50} für wt-Capan-1-Zellen (43 μM) sowie für GR-Capan-1-Zellen (58 μM) höher.

Für Panc-1-Zellen stellt sich die Datenlage ähnlich dar: Bei einer Behandlungsdauer von 96 h wurde für MS-0022 eine halbmaximale Konzentration von unter 10 μM festgestellt, während sie für GDC-0449 bereits im zweistelligen μM -Bereich lag (Strand et al., 2011). Auch für Panc-1-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit höhere IC_{50} -Werte errechnet. Einerseits kann das an der unterschiedlichen Methodik liegen, da IC_{50} Werte in unseren Versuchen mittels des xCELLigence Systems errechnet wurden. Andere Autoren verwendeten Endzeitpunkt-Versuche wie z.B. MTT- und XTT-assays. Andererseits kann die beobachtete Diskrepanz auch an den spezifischen pharmakologischen Eigenschaften von LDE225 liegen. Aufgrund der guten Übereinstimmung der xCELLigence Daten mit den parallel ermittelten Zellzahlen gehen wir davon aus, dass die beobachteten Unterschiede zu anderen SMO-Inhibitoren auf spezifische Eigenschaften von LDE225 zurückzuführen sind.

Für eine effektive Hemmung der Proliferation von GR-Capan-1 wurde ungefähr achtmal so viel LDE225 benötigt wie bei GR-Panc-1-Zellen. Dass zur effektiven Proliferationshemmung bei verschiedenen Zelllinien des PDAC auch unterschiedliche Dosen eines SMO-Inhibitors benötigt werden, wurde bereits beobachtet (Feldmann et al., 2007). Unsere Ergebnisse ließen diesbezüglich zwei Schlussfolgerungen zu: Erstens war aufgrund der unterschiedlichen Quantitäten an eingesetztem SMO-Inhibitor zu vermuten, dass die verschiedenen Zelllinien in unterschiedlich starkem Maße auf den Shh-Signalweg zurückgreifen, um ihr Proliferationsverhalten zu stimulieren. Diese Diskrepanz führte zweitens zu der Vermutung, dass Gemcitabinresistenz per se kein prädiktiver Faktor für das Anschlagen einer Therapie mit einem SMO-Inhibitor zu sein

scheint. Vielmehr muss vermutet werden, dass der Shh-Signalweg je nach Zelllinie auf unterschiedliche Weise moduliert wurde, wenn eine vorhergehende Exposition gegenüber Chemotherapeutika erfolgt war. Diese Fragestellungen sollten später anhand genetischer Analysen genauer erfasst werden.

6.2.2 Klinische Anwendbarkeit von LDE225 beim PDAC

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *in vitro*-Konzentrationen von LDE225 dürften zumindest teilweise über der klinisch tolerablen Schwelle liegen. Eine Untersuchung zu pharmakodynamisch-pharmakokinetischen Eigenschaften von SMO-Inhibitoren hat diesbezüglich ernüchternde Ergebnisse geliefert: Demnach müssten bei der Applikation von SMO-Inhibitoren *in vivo* die IC₉₅-Werte der jeweiligen Substanz verwendet werden, um einen wirksamen Effekt hinsichtlich Tumorgröße und Progress zu erzielen (Wong et al., 2011). Berücksichtigt man die abschirmende Wirkung von Tumorstroma (Hidalgo and Maitra, 2009), dürften die für pankreatische Tumorzellen benötigten Konzentrationen im Inneren des Tumors in den meisten Fällen nicht erreichbar sein.

6.2.3 Der Einfluss von LDE225 auf Gemcitabinresistenz

Wir stellten außerdem fest, dass in resistenten Zellen eine Kombination von LDE225 und Gemcitabin keinen additiven Effekt gegenüber einer LDE225-Monotherapie hinsichtlich der proliferationshemmenden Wirkung hatte. Anlass für diese Hypothese waren vielversprechende Ergebnisse bei kombinierten Therapien von Gemcitabin und anderen SMO-Inhibitoren bei *in vivo*-Versuchen (Bahra et al., 2012; Harikumar et al., 2010; Olive et al., 2009; Rhim et al., 2014). Diese Beobachtungen konnten in der vorliegenden Arbeit in dieser Form nicht bestätigt werden. Dies kann durch die unterschiedlichen experimentellen Ansätze bedingt sein: Die angegebenen *in vivo*-Modelle sind komplexer und repräsentieren die biologischen Zusammenhänge durch Vorhandensein einer Mikroumgebung (microenvironment) mit Stromazellen und putativen Krebsstammzellen (cancer stem cells, CSC, s. Kap. 2.5.3) deutlich besser als isolierte *in vitro*-Versuche an Tumorzellen. Somit bestätigen die vorliegenden Ergebnisse die bedeutende Stellung, die die komplexe Mikroumgebung bei der Erforschung einer medikamentösen Therapie des PDAC einnimmt. Wir konnten

nachweisen, dass die LDE225-vermittelte SMO-Inhibition einen Einfluss auf die Proliferation resistenter Zelllinien hatte. Jedoch verursachte LDE225 in GR-Tumorzellen keinen sensitivierenden Effekt für Gemcitabin. Dies lässt vermuten, dass die Mechanismen, die zur Gemcitabinresistenz geführt haben, nicht durch SMO-Inhibition beeinflussbar sind.

Eine Arbeit aus dem Jahr 2011 stellte fest, dass sich nach Behandlung der Gemcitabin-resistenten Pankreas-Ca-Zelllinien CFPAC-1/res und SW1990/res mit Cyclopamin die Expression von ABCB1- und ABCG2-Transportproteinen sowie von Stammzellmarkern verringerte. Dies führte im Endeffekt zu einer Resensitivierung der Zellen gegenüber Gemcitabin (Yao et al., 2011). In diesen Versuchen waren GR-Zellen allerdings während der Behandlung mit Cyclopamin für sieben Tage ohne Gemcitabin und somit ohne Selektionsdruck kultiviert worden, bevor die Reexposition gegenüber Gemcitabin erfolgte. Die Resensitivierung der GR-Zellen könnte auch wegen des Fehlens von Gemcitabin und nicht durch Zugabe von Cyclopamin zustande gekommen sein, da die Expression von ABC-Transportern bei mangelndem Selektionsdruck zurückgehen kann, sofern deren Überexpression nicht durch genetische Veränderungen verursacht wurde.

6.3 Veränderungen des Zellzyklus durch Behandlung mit LDE225 und/oder Gemcitabin

Apoptose ist während der Embryonalentwicklung und zur Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase ein entscheidender Regulationsprozess, der bei Aberration oder verminderter Funktionalität auf Tumorerkrankungen fördernd und aufrechterhaltend wirkt (Vermeulen et al., 2005). Die Induktion von Apoptose ist daher ein wünschenswertes Ziel bei der Erforschung einer medikamentösen Tumorthherapie. Während in unseren Versuchen in Capan-1-Zellen keine Apoptoseinduktion durch LDE225 beobachtet wurde, hatte die Substanz in Panc-1-Zellen einen geringfügigen pro-apoptotischen Effekt. In der Literatur finden sich hierzu unterschiedliche Daten: Strand et al. gehen nach Behandlung von Panc-1-Zellen mit Cyclopamin, MS-0022 und GDC-0449 von einem proliferationshemmenden Effekt der SMO-Inhibitoren auf Pankreas-Ca-Zelllinien aus und sehen keinen Anhalt für einen proapoptotischen Effekt

der Substanzklasse (Strand et al., 2011). Demgegenüber stehen Veröffentlichungen, die in diversen PDAC-Zelllinien mit verschiedenen SMO-Inhibitoren wie Cyclopamin, Resveratrol und GDC-0449 eine deutliche Induktion von Apoptose beobachteten (Feldmann et al., 2007; Mo et al., 2011; Singh et al., 2011). In diesen Arbeiten wurde die Zelllinie Panc-1 verwendet, nicht jedoch wie in der vorliegenden Arbeit Capan-1, weswegen unsere erzielten Ergebnisse gut mit dem derzeitigen Wissensstand in Einklang zu bringen sind. Diese anscheinend widersprüchlichen Ergebnisse sollten jedoch dazu anregen, jeden Tumor als individuelle evolutionäre Entwicklung von entarteten Zellklonen zu betrachten, die sich in ihrem genetischen und epigenetischen Hintergrund nicht zwingend gleichen müssen. Die Übersicht der Daten aus der Literatur und die unserer eigenen Versuche zeigen vielmehr, dass es sinnvoll ist, Tumore nicht nur aufgrund der Morphologie, sondern anhand ihres genetischen Mutationsspektrums zu klassifizieren. Patienten können dann anhand dieser Eigenschaften selektiert und spezifischen zielgerichteten Therapien zugeführt werden. Hierbei sollte jedoch kritisch angemerkt werden, dass sich die Kosten zur Analyse und Sequenzierung der gängigsten Krebsentitäten auf, Stand 2005, einen zweistelligen Milliardenbetrag belaufen und einen schwer abschätzbaren Aufwand bedeuten würden (Gabor Miklos, 2005).

Unsere Daten zu LDE225 zeigen, dass es als Monotherapie allenfalls geringe Veränderungen im Zellzyklus verursacht. Gemcitabin führt bekanntermaßen zu einem Anstieg der S-Phase, da es während der DNA-Replikation wirkt. Die S-Phase unter Kombinationstherapie hingegen war sowohl in wt- als auch in GR-Capan-1-Zellen geringer als unter Gemcitabin-Monotherapie. Die G1-Phase war dafür unter der Kombinationstherapie höher als in Gemcitabin-monotherapierten Capan-1-Zellen. Für Cyclopamin ist in Osteosarkom-Zellen ein G1-Arrest vorbeschrieben (Hirotsu et al., 2010) und es induziert verminderte Expression der Zellzyklus-Regulatoren Cyclin D1 sowie von Cyclin E, die für den G1-/S-Phase-Übergang zuständig sind (Li et al., 2010). Unsere Daten entsprechen weitgehend diesen Beobachtungen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist ein proliferationshemmender Einfluss von LDE225 auf GR-Capan-1-Zellen im Vergleich zu ihren wt-Geschwistern und damit ein verminderter beziehungsweise verlangsamer Übergang in die S-Phase (evtl. durch einen G1-Arrest

in GR-Capan-1 Zellen). Aufgrund der nur geringen Effekte auf den Zellzyklus haben wir auf eine tiefergehende Untersuchung der Zellzyklusregulation unter LDE225 verzichtet.

6.4 Baseline-Expression der Shh-Gene in wt- und GR-Zellen

Die Expression der vier Hauptakteure des Shh-Signalwegs *PTCH1*, *SMO*, *GLI1* und *SHH* in Pankreas-Ca-Zelllinien ist vorbeschrieben (Hwang et al., 2012; Yang et al., 2010). Doch nur wenige Arbeiten haben sich bislang mit der Verknüpfung von erworbener Chemoresistenz und Änderungen im Shh-Signalweg auseinandergesetzt. Yao et al. beobachteten in zwei Pankreas-Ca-Zelllinien nach *in vitro*-Dauerexposition eine Hochregulation der Shh-Gene (Yao et al., 2011). Ähnliches stellten auch Quint et al. hinsichtlich der Expression von *SHH* nach hochdosierter sechs-tägiger Gemcitabinbehandlung fest, wobei die besser differenzierte Zelllinie Capan-1 dort nur eine mäßige Hochregulation von *SHH* in den überlebenden Zellen zeigte (Quint et al., 2012). Die vorliegende Arbeit unterscheidet sich jedoch durch die langsame Adaptation der Zellen an Gemcitabin über viele Wochen hinweg grundlegend von den beiden oben genannten Veröffentlichungen.

6.4.1 Hh-Aktivität in wt- und GR-Zellen

In Tumorzellen des PDAC ist der Hh-Signalweg dauerhaft aktiviert (s. Kap. 2.5.1 und 2.6.1). In unseren Versuchen zeigten die Baseline-Expressionswerte von *PTCH1* und *GLI1* unterschiedlich starke Aktivierungsgrade der Hh-Signalkaskade an. Zur Expression von Hh-Aktivitätsmarkern nach chronischer Gemcitabinexposition sind in der gegenwärtigen Literatur keine Daten zu finden. Wir beobachteten in Zellen mit geringerer Hh-Aktivität auch eine geringere Proliferationsrate, was die Rolle des Hh-Signalwegs als treibende Kraft bei der Proliferation von Tumorzellen des PDAC *in vivo* (Mills et al., 2013) und *in vitro* bestätigt (Feldmann et al., 2007).

6.4.2 Expression von *SMO* und *SHH* in GR-Zellen

Durch die Dauerbehandlung mit Gemcitabin zeigten beide Zelllinien eine veränderte Expression von *SMO* und von *SHH*. Diese Veränderungen sind am ehesten als Adaptationsmechanismus zu werten und weisen darauf hin, dass unterschiedliche

Tumoren auch auf unterschiedliche Weise der Behandlung mit Gemcitabin entgegen treten können. In der GR-Variante beider Zelllinien war die *GLI1*-Expression und somit die Hh-Aktivität vermindert. Um diese aufrecht zu erhalten, scheinen GR-Panc-1-Zellen mit einer vermehrten Expression des SHH-Liganden gegenzusteuern. Dies passt zu der Erkenntnis, dass Panc-1-Zellen auf erhöhte autokrine Stimulation durch endogenes SHH angewiesen zu sein scheinen (Quint et al., 2012).

GR-Capan-1-Zellen hingegen weisen, wie auch schon Quint et al. zeigten, eine geringere Steigerung der Expression von *SHH* auf, schaffen nach unseren neuen Erkenntnissen dafür aber ein vermehrtes Angebot des weiter flussabwärts gelegenen Aktivators *SMO*. Änderungen in der Expression von *SMO* nach Behandlung mit Gemcitabin sind vorbeschrieben (Yao et al., 2011). In unseren Versuchen ging eine erhöhte Baseline-Expression von *SMO* mit einem verminderten Ansprechen auf LDE225 einher (GR-Capan-1) und umgekehrt (GR-Panc-1). Auch wenn sich die Werte von Expression und Wachstumsinhibition nicht direkt proportional waren, zeigte sich doch in beiden Zelllinien eine Assoziation zwischen Baseline-Expression und Ansprechen auf die medikamentöse Therapie. Die *SMO*-Baseline-Expression könnte daher ein Marker sein, anhand dessen sich die beiden Tumor-Zelllinien hinsichtlich ihres Ansprechens auf LDE225 klassifizieren lassen. Weitergehende Untersuchungen und funktionelle Validierungen sind hier vonnöten.

6.5 qPCR nach Behandlung mit LDE225

6.5.1 Beurteilung des Hh-Aktivierungsgrades

Die Behandlung mit Hh-Inhibitoren führte in drei von vier Zelllinien zu einer dauerhaften Reduktion der *GLI1*- und *PTCH1*-Bestände. Diese Wirkung entspricht auch dem Ergebnis vieler anderer Arbeiten, in denen unter anderem die Zelllinien Capan-1 und Panc-1 (Feldmann et al., 2007; Feldmann et al., 2008a; Strand et al., 2011) oder Zelllinien anderer Tumorentitäten zum Einsatz kamen (Decker et al., 2012; Hirotsu et al., 2010).

Auch nach Behandlung mit LDE225 weist der Vergleich der Hh-Aktivität mit dem Ansprechen auf LDE225 in beiden Zelllinien einen Zusammenhang auf: Die IC_{50} von LDE225 und die Hh-Aktivität nach *SMO*-Antagonisierung war in GR-Capan-1-Zellen

höher, in GR-Panc-1-Zellen jedoch niedriger als in ihren jeweiligen wt-Geschwistern. Dies spricht dafür, dass der Grad der Beeinträchtigung des Hh-Signalwegs direkte Auswirkungen auf die Proliferation der Tumorzellen hat. Eine Erhöhung der *GLI1*-Expression könnte allerdings auch Ursache eines Selektionsmechanismus bestimmter, *GLI1*-überexprimierender Zellen sein: Erhöhte *GLI1*-mRNA-Bestände erhöhen das Überleben von Glioblastom-Tumorzellen (Cui et al., 2010) und könnten diesen Effekt auch in pankreatischen Tumorzellen ausüben.

6.5.2 Expression von SMO und Assoziation mit der IC₅₀ von LDE225

In GR-Capan-1-Zellen war nach Behandlung mit LDE225 eine Erhöhung der *SMO*-Levels festzustellen, die aber nicht das Ausmaß der Überexpression in wt-Zellen erreichten. Diese Daten müssen allerdings vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass in GR-Capan-1-Zellen die *SMO*-Baseline-Expression beinahe das Vierfache des in wt-Zellen gemessenen Werts beträgt und somit auch ein höherer Ausgangswert vorliegt. In allen Panc-1-Zellen war hingegen die Expression von *SMO* nach Behandlung mit LDE225 deutlich reduziert, was in der Literatur auch vorbeschrieben ist (Mo et al., 2011).

Somit ist auch nach Behandlung mit dem *SMO*-Inhibitor LDE225 die *SMO*-Expression mit der IC₅₀ von LDE225 assoziiert. Man kann zu dem Schluss kommen, dass die Antwortmechanismen der Capan-1-Zelllinie auf LDE225 dieser eine erhöhte Toleranz gegenüber dem Medikament ermöglichen, während der Panc-1 Zelllinie dieser Mechanismus nicht zur Verfügung steht: Die erhöhte Expression von *SMO* nach *SMO*-Antagonisierung verhilft Capan-1-Zellen im Allgemeinen anscheinend zu besserer Toleranz gegenüber LDE225. Allerdings fehlen hierzu funktionelle Validierungen. Dass die GR-Variante der Capan-1-Zelllinie eine höhere Toleranz gegenüber LDE225 besitzt als wt-Zellen, mag unter anderem an der vorbestehenden höheren Baseline-Expression von *SMO* liegen.

Zur Expression von *SMO* nach Behandlung mit einem *SMO*-Inhibitor konnte zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit keine vergleichbare Quelle gefunden werden. Summa summarum könnte *SMO* einen neuen Parameter für das Ansprechen von Tumorzellen auf LDE225 bzw. auf *SMO*-Inhibitoren darstellen. Ailles und Siu konstatierten 2011, dass es bis dato keinen derartigen Parameter für das PDAC gebe, man aber anhand von Tumorbiopsien des Pankreas die Erfolgsaussichten von *SMO*-

Inhibitoren bestimmen könne (Ailles and Siu, 2011). Möglicherweise stellt *SMO* einen derartigen Parameter für das PDAC dar: Für die chronische lymphatische Leukämie wurden mit *PTCH1* und *GLI1* bereits zwei potentielle Marker für das Ansprechen auf SMO-Inhibitoren identifiziert (Decker et al., 2012). Quint et al. stellten bereits fest, dass die Morphologie sowie der klinische Verlauf des PDAC mit Expressionsmustern von *GLI1* und *SHH* assoziiert ist (Quint et al., 2009). *PTCH1* und *SMO* sind ebenfalls mit dem pathologischen Erscheinungsbild, Differenzierungsgrad sowie Lymphknoten- und Metastasenstatus assoziiert (Yang et al., 2010). Das Anschlagen von SMO-Inhibitoren in Tumoren mit unterschiedlichen genetischen Expressionsmustern könnte in naher Zukunft anhand klinischer Studien genauer untersucht werden.

Ein beachtliches Hindernis beim Einsatz von SMO-Inhibitoren sind Mutationen im *SMO*-Gen, die die Resistenz von Pankreas-Tumorzellen *in vitro* stark begünstigen können (Dijkgraaf et al., 2011) oder, wie in Kap. 2.6.1 beschrieben, auch *in vivo* auftreten können (Charles M. Rudin et al., 2009).

6.5.3 Expression von SHH, Kodierer des parakrinen Stimulators SHH

Die Überexpression von *SHH* im PDAC ist vorbeschrieben und wird als tragendes Element der Beteiligung des Shh-Signalwegs an dessen Entstehung und Aufrechterhaltung gesehen (Berman et al., 2003; Hidalgo and Maitra, 2009). In einer Prostata-Ca-Zelllinie konnte bereits gezeigt werden, dass Cyclopamin zu einer Herabregulation von *SHH* führt (Lou and Dean, 2007). Dieser Effekt ist auch für pankreatische CSC belegt (Singh et al., 2011). Insgesamt zeigt sich die Datenlage zur *SHH*-Expression nach Gabe eines SMO-Antagonisten noch recht dünn.

In den wt-Zellen sowohl der Capan-1- als auch der Panc-1-Zelllinie bewirkte die Behandlung mit LDE225 eine deutliche, progressive Drosselung der *SHH*-Expression. Im GR-Modell beider Zelllinien war hingegen eine Erhöhung von *SHH* zu beobachten, auch wenn diese in GR-Capan-1-Zellen erst nach 72 h einsetzte und nicht an das Expressionsniveau in GR-Panc-1-Zellen heran reichte.

Panc-1-Zellen scheinen, besonders nach Behandlung mit Gemcitabin, auf eine erhöhte Stimulation durch autokrin oder parakrin sezerniertes SHH angewiesen zu sein (Quint et al., 2012). In wt-Zellen ist ein solches Antwortverhalten anders als in GR-Zellen nicht

zu beobachten gewesen. Die erhöhte Expression von *SHH* in beiden GR-Modellen kann hingegen als ein Versuch gewertet werden, der SMO-Antagonisierung entgegenzuwirken. Dies könnte als Ansatz zu vermehrter, sogenannter „autokrine Typ-II Stimulation“ interpretiert werden (Lin and Matsui, 2012). Vermehrte Expression von *SHH* ist wahrscheinlich ein schwacher Mechanismus zur Abwehr eines SMO-Antagonisten, da die Blockade des Hh-Signalweges flussabwärts von SHH bei SMO liegt. Das vergleichsweise gute Ansprechen von GR-Panc-1-Zellen auf LDE225 wäre ein Indiz hierfür.

6.6 GLI1-Proteinexpression nach Behandlung mit LDE225

6.6.1 Vergleichende Beobachtungen der vorliegenden Arbeit

Bisherige Arbeiten stellten nach SMO-Antagonisierung eine verringerte Expression von GLI1 in PDAC- (Feldmann et al., 2007; Strand et al., 2011) oder CSC-Zelllinien (Mueller et al., 2009; Singh et al., 2011) fest. Dort waren auch die *GLI1*-mRNA-Bestände reduziert. In der vorliegenden Arbeit finden sich abweichende Ergebnisse, die zu einer differenzierten Betrachtung der Daten anhalten:

Capan-1-Zellen zeigten initial eine Hochregulation der GLI1-Proteinexpression, eine Abnahme setzte ab 48 h ein. So gesehen war in Capan-1 eine Verringerung der Hh-Signalaktivität nur bedingt gegeben. Die mRNA-Bestände waren in den GR-Zellen dieser Zelllinie nach Behandlung mit LDE225 zwar nicht gesunken, zeigten jedoch auch keinen Zusammenhang mit der Proteinexpression.

In Panc-1-Zellen wurde eine geringfügige Erhöhung von GLI1-Protein nach 48 h in wt-Zellen und eine Verringerung in GR-Zellen beobachtet. Der zeitliche Verlauf der beiden Expressionsmuster war konkordant mit der Entwicklung der *GLI1*-mRNA-Expression nach Behandlung mit LDE225. Als Parameter für die Hh-Signalaktivität gewertet, bestätigten diese Ergebnisse einen unterschiedlichen Verlauf in wt- und GR-Panc-1-Zellen. Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit eine allenfalls mäßige Baseline-Expression von GLI1-Protein festgestellt werden, wie es von pankreatischen Tumorzellen auch bekannt ist (Lauth and Toftgard, 2011). Dies deutet auf eine generell niedrige Aktivität des Hh-Signalweges in diesen Zellen hin. Zwar konnte in einem *in vivo*-Rattenmodell nach Behandlung mit Cyclopamin eine Hochregulation von GLI1-

Protein in Hirngewebe gezeigt werden (Ji et al., 2012a), doch für eine Erhöhung von GLI1 in Tumorzellen, die mit einem SMO-Inhibitor behandelt wurden, konnte in der Literatur bis dato noch kein Anhaltspunkt gefunden werden.

6.6.2 GLI1 als möglicher Indikator sekundärer zellulärer Antworten auf LDE225

Wie bereits erwähnt, korrelieren mRNA- und Proteinexpression nicht zwangsläufig miteinander (Nelson and Keller, 2007). Doch die teilweisen Diskrepanzen zwischen der Expression von *GLI1*-mRNA und GLI1-Protein bieten Raum für weitergehende Interpretationen. Zum einen sollte nicht unerwähnt bleiben, dass es in humanen Tumoren alternative Spleißvarianten von GLI1 gibt, die ebenfalls die GLI1-Proteinbestände verändern könnten (Carpenter and Lo, 2012).

Zum anderen nehmen andere Signalwege auf sogenannte nicht-kanonische Weise Einfluss auf die Aktivität des Hh-Signalweges, indem sie unabhängig von SMO direkt auf GLI1 einwirken (Lauth, 2012). KRAS, das an der Entstehung und Aufrechterhaltung des PDAC maßgeblich beteiligt ist, nimmt zum Beispiel direkten, stimulierenden Einfluss auf die Expression von GLI1 (Mazumdar et al., 2011). Wie in Kap. 2.3.3 erwähnt, können zahlreiche weitere Akteure und Signalwege Einfluss auf GLI1 nehmen ((Morris et al., 2010), (Buonamici et al., 2010), (Nolan-Stevaux et al., 2009), (Maloverjan et al., 2010). Um den Sachverhalt noch weiter zu komplizieren, gibt es GLI-unabhängige Mechanismen, die durch den Beginn der Hh-Signalkaskade ausgelöst werden: Selbst nach erfolgreicher Inhibition von SMO bieten sich Möglichkeiten zur weiteren Aktivierung durch die Hh-Signalkaskade. Es konnte gezeigt werden, dass durch das Protein PTCH1 – von SMO aus gesehen flussaufwärtsgerichtet – der MAPK-Signalweg aktiviert werden kann und somit eine Gabelung des Hh-Signalweges stattfindet (Chang et al., 2010). Nicht nur Tumorzellen, sondern auch Endothelzellen (Chinchilla et al., 2010) und vermutlich viele andere Zelltypen verfügen nach Stimulation durch SHH-Liganden über GLI-unabhängige, nicht-kanonische Mechanismen. Die Komplexität dieses Signalweges wird derzeit also allenfalls nur im Ansatz verstanden. Insgesamt ist es schlicht sehr unwahrscheinlich, dass durch den Einsatz eines SMO-Inhibitors die Hh-Signalaktivität komplett heruntergefahren wird, weil es viele Interaktionen mit anderen intrazellulären Signalwegen und Akteuren gibt.

Eine Aktivierung von GLI1 durch primär nicht berücksichtigte Faktoren sollte also erwogen werden.

Generell stellt sich die Frage, wie spezifisch der proliferationshemmende Effekt von LDE225 auf die Inhibition von SMO zurückzuführen ist, und ob die Inhibition der Zellvermehrung nicht auch andere Ursachen haben könnte. Dass SMO-Inhibitoren auch bei Abwesenheit (Zhang et al., 2009) oder Mutation (Nolan-Stevaux et al., 2009) von SMO Wirkung zeigen, legt einen bislang unbekannten, SMO-unabhängigen Wirkeffekt von SMO-Inhibitoren nahe. Dieser ist aber bislang unklar und verdient in zukünftigen Forschungsanstrengungen vermehrte Aufmerksamkeit. Wie bereits erwähnt, lagen die verwendeten Konzentrationen von LDE225 allerdings deutlich über den in anderen Arbeiten verwendeten Konzentrationen von SMO-Inhibitoren (Buonamici et al., 2010).

Die initiale Überexpression von Proteinen bei zellulärem Stress und Überbelastung des endoplasmatischen Retikulums (engl. *ER Stress*) ist bekannt (Ron and Walter, 2007). Shh-Signalaktivität mit einer Erhöhung von GLI1-Protein wurde hingegen als protektiver Faktor gegenüber Zellschädigung durch hypoxischen (Ji et al., 2012a) oder oxidativen Stress identifiziert (Dai et al., 2011). Beispielsweise führt Hypoxie als einer der bedeutendsten Stimuli für zellulären Stress in einer zeitabhängigen Manier, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit zu beobachten war, zur Überexpression von GLI1-Protein (Ji et al., 2012b). Pharmakologische Stimuli können ebenfalls eine zytotoxische Wirkung haben und zu Proteinefehlfaltungen im ER führen (Marciniak et al., 2004).

Unter diesem Aspekt betrachtet könnte die beobachtete Überexpression von GLI1-Protein auch als eine generelle Hochregulation der Proteinexpression im Sinne einer unspezifischen zellulären Antwort auf einen zytotoxischen Stimulus durch LDE225 zu interpretieren sein. Dies wäre dann als Einschränkung der Wirksamkeit von SMO-Inhibitoren auf pankreatische Tumorzellen zu werten. Eine Wirkung von LDE225, die nicht ausschließlich auf den Hh-Signalweg zurückzuführen ist, ist jedenfalls nach der Reflexion der vorliegenden Arbeit nicht auszuschließen. Ein sogenannter *off target* Effekt, der auf unspezifische Art und Weise in pankreatischen Tumorzellen funktioniert, wäre ergo zu postulieren und sollte in künftigen Studien genauer

untersucht werden, denn die Interaktionen der verschiedenen zellulären Signalwege sind mannigfaltig und können bislang nur schwer nachvollzogen werden.

6.7 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die LDE225-vermittelte SMO-Inhibition in den untersuchten Zelllinien erst in relativ hohen Konzentrationen antiproliferative Effekte zeigt. Diese Effekte waren dosisabhängig, von der erworbenen Gemcitabinresistenz beeinflusst und außerdem mit dem Grad der SMO-Baseline-Expression assoziiert. Ein Synergieeffekt der Kombinationstherapie von LDE225 und Gemcitabin auf die zelluläre Proliferationsrate konnte nicht beobachtet werden. Ein nennenswerter Effekt von LDE225 auf Zellzyklus oder Apoptose war nicht festzustellen.

Es wurde eine dauerhafte Hh-Aktivierung nachgewiesen, wodurch auch die zelluläre Proliferation gefördert wurde. Hh-Aktivität sowie die Expression von *SHH* und *SMO* zeigten sich individuell verändert und abhängig von erworbener Gemcitabinresistenz. Es wurden verschiedenartige Antwortmechanismen auf SMO-Antagonisierung beobachtet: Die Zellen reagierten mit einer Erhöhung der Hh-Aktivität, einer Heraufregulation von *SMO* oder einer erhöhten parakrinen Stimulierung.

Die Ergebnisse zeigen auf, dass die große biologische Variabilität innerhalb der Tumorzelllinien zu unterschiedlichen molekularbiologischen Effekten führen kann. Eine alleinige SMO-gerichtete („single-targeted“) Therapie mittels LDE225 hat nur begrenzte Effekte auf isolierte Tumorzellen, entfaltet aber im komplexen biologischen System (Tumorzellen, Stroma, CSC) ihr Potenzial.

6.8 Limitierungen der Arbeit

Ein Großteil des Arbeitsaufwandes floss in die genetische Analyse des Hh-Signalwegs, der in den eingesetzten Zelllinien eine große Variabilität zeigte. Um der biologischen Variabilität des PDAC gerecht zu werden, müsste jedoch eine deutlich größere Anzahl an Zelllinien herangezogen werden, wofür in diesem Ein-Mann-Projekt nicht die Zeit und das Personal vorhanden waren. Eine Vergrößerung der Stichproben – z.B. mittels high-throughput-Verfahren - könnte zur besseren Validierung der Ergebnisse

beitragen. Zum Ausschluss eines sogenannten *off target*-Effekts von LDE225 wären außerdem funktionelle Validierungen der beobachteten Veränderungen der Genexpression, zum Beispiel mittels siRNA, sowie Untersuchungen zum Zusammenspiel des Shh mit anderen Signalwegen und Akteuren vonnöten.

Die Untersuchungen zum Zellzyklus sowie zur Genexpression sind außerdem nicht mit *in vivo*-Daten zu vergleichen, da sich in der Zellkultur durch das häufige Passagieren ein Selektionsdruck ausbildet und die Zellen Mutationen anhäufen. Auch die Einflussnahme des Tumorstromas, der CSC sowie der EMT auf die Hh-Signalkaskade in Tumorzellen des PDAC konnte nicht berücksichtigt werden. Mit Hilfe von Untersuchungen im Mausmodell sowie von klinischen Studien könnte man die gesammelten Ergebnisse auf das komplexe biologische System Tier respektive Mensch übertragen. Daher ist die vorliegende Arbeit als Pilotprojekt zu verstehen, um eine bislang wenig beachtete Thematik auszuarbeiten und für zukünftige Untersuchungen zugänglich zu machen.

6.8 Ausblick

Die medikamentöse Therapie des PDAC ist nach wie vor unbefriedigend. Seit zehn Jahren beschäftigt sich die Krebsforschung zunehmend mit der zielgerichteten Inhibition zellulärer Signalkaskaden, und diese Entwicklung ist auch beim Pankreaskarzinom festzustellen. Im PDAC und anderen Tumorentitäten werden klinisch bereits Antikörper eingesetzt, und mit den niedermolekularen Antagonisten hat sich ein weiterer potentieller Kandidat zur Krebsbekämpfung gefunden.

Ein weiterer Aspekt der modernen Krebsforschung ist die differenzierte Betrachtung einzelner Tumorentitäten anhand ihres genetischen und epigenetischen Profils. Tumoren des Pankreas beispielsweise können je nach der dominierenden Mutation eher mit dem Medulloblastom (*SMO*) oder aber mit dem Gorlin-Syndrom (*PTCH1*) biologisch verwandt sein, während innerhalb der Entität PDAC große Unterschiede hinsichtlich der genetischen Ausstattung bestehen. Seine biologische Variabilität macht den Begriff PDAC daher mittlerweile zu einer anatomischen Zuordnung, während zur funktionellen Beurteilung heutzutage molekulare und biologische Faktoren entscheidend sind. Vor diesem Hintergrund ist es entscheidend,

Signalkaskaden und Akteure zu identifizieren, die an „strategischen“ Punkten zur individualisierten Tumorthherapie angreifbar sind. Der Hh-Signalweg hat sich hierbei zwar als potentielles Ziel erwiesen, doch die vielversprechenden Ansätze der gegenwärtigen Forschung zeigen zahlreiche Limitierungen:

Seien es das schlechte Ansprechen der Primärtumoren auf SMO-Antagonisten (Olive et al., 2009), das Auftreten von Chemoresistenz (Hidalgo and Maitra, 2009) oder von therapieresistenten Metastasen durch neue Mutationen (Charles M. Rudin et al., 2009), die schlechte Vaskularisierung der Primärtumoren (Olive et al., 2009), die veränderten biologischen Verhältnisse innerhalb des Tumorstromas (Chu et al., 2007) oder aber die Ambivalenz des Tumorstromas in seinem Beitrag zur Malignität des PDAC (Rhim et al., 2014): Eine einfache Therapiestrategie hat bislang in keinem Ansatz zum Ziel geführt und ein ganz entscheidendes Problem scheint hierbei der Zeitpunkt der Intervention zu sein. Multimodale Ansätze zur Tumorbehandlung, bei denen an genau definierten Zeitpunkten ein Akteur der Tumorgenese ausgeschaltet wird, wären deshalb eine diskutable Option. Im Falle des PDAC wäre zum Beispiel eine initiale Behandlung mit SMO-Inhibitoren zur Ausschaltung des Tumorstromas (Hwang et al., 2012), gefolgt von einer zytostatischen Therapie mit Gemcitabin und Erlotinib (Moore et al., 2007) sowie bei Patienten mit guter Tumolvaskularisation eine antiangiogenetische Therapie mit VEGF-Rezeptor-Inhibitoren (Rhim et al., 2014), denkbar. Aufgrund ihrer Wirkung auf CSC und EMT käme zur abschließenden Metastasen- und Rezidivprophylaxe ein erneuter Einsatz von Hh-Inhibitoren in Betracht (Krantz et al., 2012; Singh et al., 2011). Wünschenswert wäre außerdem eine Identifikation genetischer Risikofaktoren des PDAC zur Früherkennung potentieller Patienten, sowie die Stratifizierung und Zuordnung der Patienten zu ihrem individuellen Therapieregime anhand vorbestehender und erworbener Risikofaktoren.

7. Literaturverzeichnis

- Ailles, L., and L. L. Siu, 2011, Targeting the Hedgehog Pathway in Cancer: Can the Spines Be Smoothened?: *Clinical Cancer Research*, v. 17, p. 2071-2073.
- Arndtjovin, D. J., and T. M. Jovin, 1989, FLUORESCENCE LABELING AND MICROSCOPY OF DNA: *Methods in Cell Biology*, v. 30.
- Aszterbaum, M., A. Rothman, R. L. Johnson, M. Fisher, J. W. Xie, J. M. Bonifas, X. L. Zhang, M. P. Scott, and E. H. Epstein, 1998, Identification of mutations in the human PATCHED gene in sporadic basal cell carcinomas and in patients with the basal cell nevus syndrome: *Journal of Investigative Dermatology*, v. 110.
- Atienza, J. M., J. Zhu, X. B. Wang, X. Xu, and Y. Abassi, 2005, Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays: *Journal of Biomolecular Screening*, v. 10.
- AWMF, D. K. e.V., and D. K. e.V., 2013, S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom, Berlin.
- Bahra, M., C. Kamphues, S. Boas-Knoop, S. Lippert, U. Esendik, U. Schueller, W. Hartmann, A. Waha, P. Neuhaus, F. Heppner, T. Pietsch, and A. Koch, 2012, Combination of Hedgehog Signaling Blockage and Chemotherapy Leads to Tumor Reduction in Pancreatic Adenocarcinomas: *Pancreas*, v. 41.
- Berman, D. M., S. S. Karhadkar, A. Maitra, R. M. de Oca, M. R. Gerstenblith, K. Briggs, A. R. Parker, Y. Shimada, J. R. Eshleman, D. N. Watkins, and P. A. Beachy, 2003, Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours: *Nature*, v. 425, p. 846-851.
- Blotta, S., J. Jakubikova, T. Calimeri, A. M. Roccaro, N. Amodio, A. K. Azab, U. Foresta, C. S. Mitsiades, M. Rossi, K. Todoerti, S. Molica, F. Morabito, A. Neri, P. Tagliaferri, P. Tassone, K. C. Anderson, and N. C. Munshi, 2012, Canonical and noncanonical Hedgehog pathway in the pathogenesis of multiple myeloma: *Blood*, v. 120, p. 5002-5013.
- Bonnet, D., and J. E. Dick, 1997, Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell: *Nature Medicine*, v. 3.
- Buonamici, S., J. Williams, M. Morrissey, A. Wang, R. Guo, A. Vattay, K. Hsiao, J. Yuan, J. Green, B. Ospina, Q. Yu, L. Ostrom, P. Fordjour, D. L. Anderson, J. E. Monahan, J. F. Kelleher, S. Peukert, S. Pan, X. Wu, S.-M. Maira, C. Garcia-Echeverria, K. J. Briggs, D. N. Watkins, Y.-m. Yao, C. Lengauer, M. Warmuth, W. R. Sellers, and M. Dorsch, 2010, Interfering with Resistance to Smoothed Antagonists by Inhibition of the PI3K Pathway in Medulloblastoma: *Science Translational Medicine*, v. 2.
- Burris, H. A., M. J. Moore, J. Andersen, M. R. Green, M. L. Rothenberg, M. R. Madiano, M. C. Cripps, R. K. Portenoy, A. M. Storniolo, P. Tarassoff, R. Nelson, F. A. Dorr, C. D. Stephens, and D. D. VanHoff, 1997, Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: A randomized trial: *Journal of Clinical Oncology*, v. 15.
- Carpenter, R. L., and H.-W. Lo, 2012, Hedgehog pathway and GLI1 isoforms in human cancer: *Discovery medicine*, v. 13, p. 105-13.
- Chang, H., Q. Li, R. C. Moraes, M. T. Lewis, and P. A. Hamel, 2010, Activation of Erk by sonic hedgehog independent of canonical hedgehog signalling: *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 42, p. 1462-1471.
- Charles M. Rudin, M. D., Ph.D., M. D. Christine L. Hann, Ph.D., M. D. John Laterra, Ph.D., P. D. Robert L. Yauch, M. D. Christopher A. Callahan, Ph.D., M. D. Ling Fu, M. S. Thomas Holcomb, B. S. Jeremy Stinson, P. D. Stephen E. Gould, R. N. Barbara Coleman, C.C.R.P., D. O. Patricia M. LoRusso, M. D. Daniel D. Von Hoff, P. D. Frederic J. de Sauvage, and M. D. and Jennifer A. Low, Ph.D., 2009, Treatment of Medulloblastoma

- with Hedgehog Pathway Inhibitor GDC-0449, *N Engl J Med*, p. 1173-8.
- Chenna, V., C. Hu, D. Pramanik, B. T. Aftab, C. Karikari, N. R. Campbell, S.-M. Hong, M. Zhao, M. A. Rudek, S. R. Khan, C. M. Rudin, and A. Maitra, 2012, A Polymeric Nanoparticle Encapsulated Small-Molecule Inhibitor of Hedgehog Signaling (NanoHHI) Bypasses Secondary Mutational Resistance to Smoothed Antagonists: *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 11.
- Chinchilla, P., L. Xiao, M. G. Kazanietz, and N. A. Riobo, 2010, Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways: *Cell Cycle*, v. 9.
- Chu, G. C., A. C. Kimmelman, A. F. Hezel, and R. A. DePinho, 2007, Stromal biology of pancreatic cancer: *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 101.
- Clement, V., P. Sanchez, N. de Tribolet, I. Radovanovic, and A. R. I. Altaba, 2007, HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity: *Current Biology*, v. 17.
- Conroy, T., F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, A. Adenis, J.-L. Raoul, S. Gourgou-Bourgade, C. de la Fouchardiere, J. Bennouna, J.-B. Bachet, F. Khemissa-Akouz, D. Pere-Verge, C. Delbaldo, E. Assenat, B. Chauffert, P. Michel, C. Montoto-Grillot, M. Ducreux, U. Grp Tumeurs Digestives, and P. Intergrp, 2011, FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer: *New England Journal of Medicine*, v. 364, p. 1817-1825.
- Cui, D., Q. Xu, K. Wang, and X. Che, 2010, Gli1 is a potential target for alleviating multidrug resistance of gliomas: *Journal of the Neurological Sciences*, v. 288, p. 156-166.
- Da Violante, G., N. Zerrouk, I. Richard, G. Provot, J. C. Chaumeil, and P. Arnaud, 2002, Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco(2)/TC7 colon tumor cell cultures: *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 25.
- Dai, R.-L., S.-Y. Zhu, Y.-P. Xia, L. Mao, Y.-W. Mei, Y.-F. Yao, Y.-M. Xue, and B. Hu, 2011, Sonic Hedgehog Protects Cortical Neurons Against Oxidative Stress: *Neurochemical Research*, v. 36.
- Danquah, M. K., X. A. Zhang, and R. I. Mahato, 2011, Extravasation of polymeric nanomedicines across tumor vasculature: *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 63, p. 623-639.
- Decker, S., K. Zirlik, L. Djebatchie, D. Hartmann, G. Ihorst, A. Schmitt-Graeff, D. Herchenbach, H. Jumaa, M. Warmuth, H. Veelken, and C. Dierks, 2012, Trisomy 12 and elevated GLI1 and PTCH1 transcript levels are biomarkers for Hedgehog-inhibitor responsiveness in CLL: *Blood*, v. 119, p. 997-1007.
- Dessaud, E., A. P. McMahon, and J. Briscoe, 2008, Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network: *Development*, v. 135.
- Dijkgraaf, G. J. P., B. Alicke, L. Weinmann, T. Januario, K. West, Z. Modrusan, D. Burdick, R. Goldsmith, K. Robarge, D. Sutherlin, S. J. Scales, S. E. Gould, R. L. Yauch, and F. J. de Sauvage, 2011, Small Molecule Inhibition of GDC-0449 Refractory Smoothed Mutants and Downstream Mechanisms of Drug Resistance: *Cancer Research*, v. 71.
- Dosch, J. S., M. P. di Magliano, and D. M. Simeone, 2010, Pancreatic Cancer and Hedgehog Pathway Signaling: New Insights: *Pancreatology*, v. 10, p. 151-157.
- Du, Z., R. Qin, C. Wei, M. Wang, C. Shi, R. Tian, and C. Peng, 2011, Pancreatic Cancer Cells Resistant to Chemoradiotherapy Rich in "Stem-Cell-Like" Tumor Cells: *Digestive Diseases and Sciences*, v. 56.
- Duman-Scheel, M., L. Weng, S. J. Xin, and W. Du, 2002, Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing cyclin D and cyclin E: *Nature*, v. 417, p. 299-304.
- Epstein, E. H., 2008, Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog: *Nature Reviews Cancer*, v. 8.
- Fan, L., C. V. Pepicelli, C. C. Dibble, W. Catbagan, J. L. Zarycki, R. Laciak, J. Gipp, A. Shaw, M. L. G. Lamm, A. Munoz, R. Lipinski, J. B. Thrasher, and W. Bushman, 2004, Hedgehog signaling promotes prostate xenograft tumor growth: *Endocrinology*, v. 145.

- Feldmann, G., S. Dhara, V. Fendrich, D. Bedja, R. Beaty, M. Mullendore, C. Karikari, H. Alvarez, C. Iacobuzio-Donahue, A. Jimeno, K. L. Gabrielson, W. Matsui, and A. Maitra, 2007, Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: A new paradigm for combination therapy in solid cancers: *Cancer Research*, v. 67, p. 2187-2196.
- Feldmann, G., V. Fendrich, K. McGovern, D. Bedja, S. Bisht, H. Alvarez, J.-B. M. Koorstra, N. Habbe, C. Karikari, M. Mullendore, K. L. Gabrielson, R. Sharma, W. Matsui, and A. Maitra, 2008a, An orally bioavailable small-molecule inhibitor of Hedgehog signaling inhibits tumor initiation and metastasis in pancreatic cancer: *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 7, p. 2725-2735.
- Feldmann, G., N. Habbe, S. Dhara, S. Bisht, H. Alvarez, V. Fendrich, R. Beaty, M. Mullendore, C. Karikari, N. Bardeesy, M. M. Ouellette, W. Yu, and A. Maitra, 2008b, Hedgehog inhibition prolongs survival in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer: *Gut*, v. 57, p. 1420-1430.
- Fendrich, V., F. Esni, M. V. R. Garay, G. Feldmann, N. Habbe, J. N. Jensen, Y. Dor, D. Stoffers, J. Jensen, S. D. Leach, and A. Maitra, 2008, Hedgehog signaling is required for effective regeneration of exocrine pancreas: *Gastroenterology*, v. 135.
- Fendrich, V., D. Wiese, J. Waldmann, M. Lauth, A. E. Heverhagen, J. Rehm, and D. K. Bartsch, 2011, Hedgehog Inhibition With the Orally Bioavailable Smo Antagonist LDE225 Represses Tumor Growth and Prolongs Survival in a Transgenic Mouse Model of Islet Cell Neoplasms: *Annals of Surgery*, v. 254, p. 818-823.
- Fietzl, M. J., J.-P. Goncordet, R. Barbosal, R. Johnson, S. Kraussl, A. P. McMahon, C. Tabin, and P. W. Ingham, 1994, The hedgehog gene family in *Drosophila* and vertebrate development: *Development. Supplement.*, p. 43-51.
- Gabor Miklos, G. L., 2005, The human cancer genome project--one more misstep in the war on cancer: *Nature biotechnology*, v. 23, p. 535-7.
- Gailani, M. R., M. StahleBackdahl, D. J. Leffell, M. Glynn, P. G. Zaphiropoulos, C. Pressman, A. B. Uden, M. Dean, D. E. Brash, A. E. Bale, and R. Toftgard, 1996, The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas: *Nature Genetics*, v. 14.
- Harikumar, K. B., A. B. Kunnumakkara, G. Sethi, P. Diagaradjane, P. Anand, M. K. Pandey, J. Gelovani, S. Krishnan, S. Guha, and B. B. Aggarwal, 2010, Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer: *International Journal of Cancer*, v. 127, p. 257-268.
- Hidalgo, M., and A. Maitra, 2009, The Hedgehog Pathway and Pancreatic Cancer: *New England Journal of Medicine*, v. 361, p. 2094-2096.
- Hirotsu, M., T. Setoguchi, H. Sasaki, Y. Matsunoshita, H. Gao, H. Nagao, O. Kunigou, and S. Komiya, 2010, Smoothed as a new therapeutic target for human osteosarcoma: *Molecular Cancer*, v. 9.
- Hong, S. P., J. Wen, S. Bang, S. Park, and S. Y. Song, 2009, CD44-positive cells are responsible for gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells: *International Journal of Cancer*, v. 125.
- Huang, C., and K. Xie, 2012, Crosstalk of Sp1 and Stat3 signaling in pancreatic cancer pathogenesis: *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 23, p. 25-35.
- Hwang, R. F., T. T. Moore, M. M. Hattersley, M. Scarpitti, B. Yang, E. Devereaux, V. Ramachandran, T. Arumugam, B. Ji, C. D. Logsdon, J. L. Brown, and R. Godin, 2012, Inhibition of the hedgehog pathway targets the tumor-associated stroma in pancreatic cancer: *Molecular cancer research : MCR*, v. 10.
- Ingham, P. W., and A. P. McMahon, 2001, Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles: *Genes & Development*, v. 15.
- Ji, H., J. Miao, X. Zhang, Y. Du, H. Liu, S. Li, and L. Li, 2012a, Inhibition of sonic hedgehog signaling aggravates brain damage associated with the down-regulation of Gli1, Ptch1 and SOD1 expression in acute ischemic stroke: *Neuroscience Letters*, v. 506.

- Ji, H., X. Zhang, Y. Du, H. Liu, S. Li, and L. Li, 2012b, Polydatin modulates inflammation by decreasing NF-kappa B activation and oxidative stress by increasing Gli1, Ptch1, SOD1 expression and ameliorates blood-brain barrier permeability for its neuroprotective effect in pMCAO rat brain: *Brain Research Bulletin*, v. 87.
- Johnson, R. L., R. D. Riddle, E. Laufer, and C. Tabin, 1994, SONIC HEDGEHOG - A KEY MEDIATOR OF ANTERIOR-POSTERIOR PATTERNING OF THE LIMB AND DORSOVENTRAL PATTERNING OF AXIAL EMBRYONIC STRUCTURES: *Biochemical Society Transactions*, v. 22.
- Jones, S., X. Zhang, D. W. Parsons, J. C.-H. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, H. Kamiyama, A. Jimeno, S.-M. Hong, B. Fu, M.-T. Lin, E. S. Calhoun, M. Kamiyama, K. Walter, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, J. Hartigan, D. R. Smith, M. Hidalgo, S. D. Leach, A. P. Klein, E. M. Jaffee, M. Goggins, A. Maitra, C. Iacobuzio-Donahue, J. R. Eshleman, S. E. Kern, R. H. Hruban, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu, and K. W. Kinzler, 2008, Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses: *Science*, v. 321, p. 1801-1806.
- Joost, S., L. L. Almada, V. Rohnlalter, P. S. Holz, A. M. Vrabel, M. G. Fernandez-Barrena, R. R. McWilliams, M. Krause, M. E. Fernandez-Zapico, and M. Lauth, 2012, GLI1 Inhibition Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Cells: *Cancer Research*, v. 72.
- Jorgensen, J., 2001, Resected adenocarcinoma of the pancreas - 616 patients: Results, outcomes, and prognostic indicators: *Journal of Gastrointestinal Surgery*, v. 5, p. 681-681.
- Kaatsch, P., C. Spix, S. Hentschel, A. Katalinic, S. Luttmann, and C. Stegmaier, 2013, Krebs in Deutschland, Berlin, Robert-Koch-Institut Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
- Kaatsch, P., C. Spix, A. Katalinic, and S. Hentschel, 2012, Krebs in Deutschland 2007/2008, Berlin, Robert-Koch-Institut Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., p. 135.
- Kalluri, R., and R. A. Weinberg, 2009, The basics of epithelial-mesenchymal transition: *Journal of Clinical Investigation*, v. 119.
- Katoh, Y., and M. Katoh, 2009, Hedgehog Target Genes: Mechanisms of Carcinogenesis Induced by Aberrant Hedgehog Signaling Activation: *Current Molecular Medicine*, v. 9.
- Ke, N., X. Wang, X. Xu, and Y. A. Abassi, 2011, The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, v. 740.
- Krantz, S. B., M. A. Shields, S. Dangi-Garimella, H. G. Munshi, and D. J. Bentrem, 2012, Contribution of Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells to Pancreatic Cancer Progression: *Journal of Surgical Research*, v. 173.
- Lai, K., M. J. Robertson, and D. V. Schaffer, 2004, The Sonic hedgehog signaling system as a bistable genetic switch: *Biophysical Journal*, v. 86.
- Lauth, M., 2012, RAS and Hedgehog--partners in crime: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, v. 17, p. 2259-70.
- Lauth, M., A. Bergstrom, T. Shimokawa, and R. Toftgard, 2007, Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, p. 8455-8460.
- Lauth, M., A. Bergstrom, T. Shimokawa, U. Tostar, Q. Jin, V. Fendrich, C. Guerra, M. Barbacid, and R. Toftgard, 2010, DYRK1B-dependent autocrine-to-paracrine shift of Hedgehog signaling by mutant RAS: *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 17.
- Lauth, M., and R. Toftgard, 2011, Hedgehog Signaling and Pancreatic Tumor Development: *Advances in Cancer Research*, Vol 110, v. 110.
- Lee, C. J., J. Dosch, and D. M. Simeone, 2008, Pancreatic cancer stem cells: *Journal of Clinical Oncology*, v. 26, p. 2806-2812.

- Legoffic, A., E. L. Calvo, M. Barthet, J.-R. Delpero, J. C. Dagorn, and J. L. Iovanna, 2009, Identification of Genomic Alterations Associated with the Aggressiveness of Pancreatic Cancer Using an Ultra-High-Resolution CGH Array: *Pancreatology*, v. 9, p. 267-272.
- Li, C., D. G. Heidt, P. Dalerba, C. F. Burant, L. Zhang, V. Adsay, M. Wicha, M. F. Clarke, and D. M. Simeone, 2007, Identification of pancreatic cancer stem cells: *Cancer Research*, v. 67.
- Li, D. H., J. J. Zhu, P. F. Firozi, J. L. Abbruzzese, D. B. Evans, K. Cleary, H. Friess, and S. Sen, 2003, Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/aurora A kinase in human pancreatic cancer: *Clinical Cancer Research*, v. 9.
- Li, F., M. Duman-Scheel, D. Yang, W. Du, J. Zhang, C. Zhao, L. Qin, and S. Xin, 2010, Sonic Hedgehog Signaling Induces Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation via Induction of the G(1) Cyclin-Retinoblastoma Axis: *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, v. 30.
- Lieber, M., J. Mazzeita, W. Nelsonreese, M. Kaplan, and G. Todaro, 1975, ESTABLISHMENT OF A CONTINUOUS TUMOR-CELL LINE (PANC-1) FROM A HUMAN CARCINOMA OF EXOCRINE PANCREAS: *International Journal of Cancer*, v. 15.
- Lin, T. L., and W. Matsui, 2012, Hedgehog pathway as a drug target: Smoothed inhibitors in development: *Oncotargets and Therapy*, v. 5, p. 47-58.
- Lou, H., and M. Dean, 2007, Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters: *Oncogene*, v. 26, p. 1357-1360.
- Lowenfels, A. B., and P. Maisonneuve, 2006, Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer: *Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology*, v. 20, p. 197-209.
- Lunardi, S., R. J. Muschel, and T. B. Brunner, 2014, The stromal compartments in pancreatic cancer: Are there any therapeutic targets?: *Cancer Letters*, v. 343, p. 147-155.
- Maloverjan, A., M. Piirsoo, L. Kasak, L. Peil, T. Osterlund, and P. Kogerman, 2010, Dual Function of UNC-51-like Kinase 3 (Ulk3) in the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: *Journal of Biological Chemistry*, v. 285.
- Marciniak, S. J., C. Y. Yun, S. Oyadomari, I. Novoa, Y. H. Zhang, R. Jungreis, K. Nagata, H. P. Harding, and D. Ron, 2004, CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum: *Genes & Development*, v. 18.
- Mazumdar, T., J. DeVecchio, A. Agyeman, T. Shi, and J. A. Houghton, 2011, The GLI genes as the molecular switch in disrupting Hedgehog signaling in colon cancer: *Oncotarget*, v. 2.
- Meloni, A. R., G. B. Fralish, P. Kelly, A. Salahpour, J. K. Chen, R. J. Wechsler-Reya, R. J. Lefkowitz, and M. G. Caron, 2006, Smoothed signal transduction is promoted by G protein-coupled receptor kinase 2: *Molecular and Cellular Biology*, v. 26.
- Merchant, M., F. F. Vajdos, M. Utsch, H. R. Maun, U. Wendt, J. Cannon, W. Desmarais, R. A. Lazarus, A. M. de Vos, and F. J. de Sauvage, 2004, Suppressor of fused regulates Gli activity through a dual binding mechanism: *Molecular and Cellular Biology*, v. 24.
- Mills, L. D., Y. Zhang, R. J. Marler, M. Herreros-Villanueva, L. Zhang, L. L. Almada, F. Couch, C. Wetmore, M. P. di Magliano, and M. E. Fernandez-Zapico, 2013, Loss of the Transcription Factor GLI1 Identifies a Signaling Network in the Tumor Microenvironment Mediating KRAS Oncogene-induced Transformation: *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, p. 11786-11794.
- Mo, W., X. Xu, L. Xu, F. Wang, A. Ke, X. Wang, and C. Guo, 2011, Resveratrol Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis through the Hedgehog Signaling Pathway in Pancreatic Cancer Cell: *Pancreatology*, v. 11, p. 601-609.
- Moore, M. J., D. Goldstein, J. Hamm, A. Figer, J. R. Hecht, S. Gallinger, H. J. Au, P. Murawa, D. Walde, R. A. Wolff, D. Campos, R. Lim, K. Ding, G. Clark, T. Voskoglou-Nomikos, M. Ptasynski, and W. Parulekar, 2007, Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: A phase III trial of the National Cancer Institute of Canada clinical trials group: *Journal of Clinical Oncology*, v. 25, p. 1960-1966.

- Morris, J. P., S. C. Wang, and M. Hebrok, 2010, KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma: *Nature Reviews Cancer*, v. 10.
- Mueller, M.-T., P. C. Hermann, J. Witthauer, B. Rubio-Viqueira, S. F. Leicht, S. Huber, J. W. Ellwart, M. Mustafa, P. Bartenstein, J. G. D'Haese, M. H. Schoenberg, F. Berger, K.-W. Jauch, M. Hidalgo, and C. Heeschen, 2009, Combined Targeted Treatment to Eliminate Tumorigenic Cancer Stem Cells in Human Pancreatic Cancer: *Gastroenterology*, v. 137, p. 1102-1113.
- Nelson, P. T., and J. N. Keller, 2007, RNA in brain disease: No longer just "the messenger in the middle": *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 66.
- Ng, J. M. Y., and T. Curran, 2011, The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer: *Nature Reviews Cancer*, v. 11.
- Nolan-Stevaux, O., J. Lau, M. L. Truitt, G. C. Chu, M. Hebrok, M. E. Fernandez-Zapico, and D. Hanahan, 2009, GLI1 is regulated through Smoothed-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation: *Genes & Development*, v. 23, p. 24-36.
- Nüsslein-Vollhard, C., and E. Wieschaus, 1980, Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*: *Nature*, v. 287, p. 795-801.
- O'Toole, S. A., D. A. Machalek, R. F. Shearer, E. K. A. Millar, R. Nair, P. Schofield, D. McLeod, C. L. Cooper, C. M. McNeil, A. McFarland, N. Akira, C. J. Ormandy, M. R. Qiu, B. Rabinovich, L. G. Martelotto, V. Duc, G. E. Hannigan, E. A. Musgrove, D. Christ, R. L. Sutherland, D. N. Watkins, and A. Swarbrick, 2011, Hedgehog Overexpression Is Associated with Stromal Interactions and Predicts for Poor Outcome in Breast Cancer: *Cancer Research*, v. 71.
- Olive, K. P., M. A. Jacobetz, C. J. Davidson, A. Gopinathan, D. McIntyre, D. Honess, B. Madhu, M. A. Goldgraben, M. E. Caldwell, D. Allard, K. K. Frese, G. DeNicola, C. Feig, C. Combs, S. P. Winter, H. Ireland-Zecchini, S. Reichelt, W. J. Howat, A. Chang, M. Dhara, L. Wang, F. Rueckert, R. Gruetzmänn, C. Pilarsky, K. Izeradjene, S. R. Hingorani, P. Huang, S. E. Davies, W. Plunkett, M. Egorin, R. H. Hruban, N. Whitebread, K. McGovern, J. Adams, C. Iacobuzio-Donahue, J. Griffiths, and D. A. Tuveson, 2009, Inhibition of Hedgehog Signaling Enhances Delivery of Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer: *Science*, v. 324, p. 1457-1461.
- Pan, S., X. Wu, J. Jiang, W. Gao, Y. Wan, D. Cheng, D. Han, J. Liu, N. P. Englund, Y. Wang, S. Peukert, K. Miller-Moslin, J. Yuan, R. Guo, M. Matsumoto, A. Vattay, Y. Jiang, J. Tsao, F. Sun, A. C. Pferdekammer, S. Dodd, T. Tuntland, W. Maniara, J. F. Kelleher, III, Y.-m. Yao, M. Warmuth, J. Williams, and M. Dorsch, 2010, Discovery of NVP-LDE225, a Potent and Selective Smoothed Antagonist: *Acs Medicinal Chemistry Letters*, v. 1, p. 130-134.
- Peinado, H. C., F. Portillo, and A. Cano, 2004, Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis: *International Journal of Developmental Biology*, v. 48.
- Quint, K., S. Stintzing, B. Alinger, C. Hauser-Kronberger, O. Dietze, S. Gahr, E. G. Hahn, M. Ocker, and D. Neureiter, 2009, The Expression Pattern of PDX-1, SHH, Patched and Gli-1 Is Associated with Pathological and Clinical Features in Human Pancreatic Cancer: *Pancreatology*, v. 9, p. 116-126.
- Quint, K., M. Tonigold, P. Di Fazio, R. Montalbano, S. Lingelbach, F. Rückert, B. Alinger, M. Ocker, and D. Neureiter, 2012, Pancreatic cancer cells surviving gemcitabine treatment express markers of stem cell differentiation and epithelial-mesenchymal transition: *International Journal of oncology*.
- Rhim, A. D., P. E. Oberstein, D. H. Thomas, E. T. Mirek, C. F. Palermo, S. A. Sastra, E. N. Dekleva, T. Saunders, C. P. Becerra, I. W. Tattersall, C. B. Westphalen, J. Kitajewski, F.-B. M.G., M. E. Fernandez-Zapico, C. Iacobuzio-Donahue, K. P. Olive, and B. Z. Stanger, 2014, Stromal Elements Act to Restrain, Rather Than Support, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: *Cancer Cell* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.021>.

- Romer, J. T., H. Kimura, S. Magdaleno, K. Sasai, C. Fuller, H. Baines, M. Connelly, C. F. Stewart, S. Gould, L. L. Rubin, and T. Curran, 2004, Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-) p53(-/-) mice: *Cancer Cell*, v. 6.
- Rominger, C. M., W. L. T. Bee, R. A. Copeland, E. A. Davenport, A. Gilmartin, R. Gontarek, K. R. Hornberger, L. A. Kallal, Z. Lai, K. Lawrie, Q. Lu, L. McMillan, M. Truong, P. J. Tummino, B. Turunen, M. Will, W. J. Zuercher, and D. H. Rominger, 2010, Evidence for Allosteric Interactions of Antagonist Binding to the Smoothed Receptor (vol 329, pg 995, 2009): *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 332.
- Ron, D., and P. Walter, 2007, Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 8.
- Shah, A. N., J. M. Summy, J. Zhang, S. I. Park, N. U. Parikh, and G. E. Gallick, 2007, Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells: *Annals of Surgical Oncology*, v. 14.
- Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, 2012, Cancer Statistics, 2012: *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, v. 62, p. 10-29.
- Singh, B. N., J. Fu, R. K. Srivastava, and S. Shankar, 2011, Hedgehog Signaling Antagonist GDC-0449 (Vismodegib) Inhibits Pancreatic Cancer Stem Cell Characteristics: *Molecular Mechanisms: Plos One*, v. 6.
- Singh, S. K., C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano, and P. B. Dirks, 2004, Identification of human brain tumour initiating cells: *Nature*, v. 432.
- Sipos, B., S. Moser, H. Kalthoff, V. Torok, M. Lohr, and G. Kloppel, 2003, A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform: *Virchows Archiv*, v. 442.
- Strand, M. F., S. R. Wilson, J. L. Dembinski, D. D. Holworth, A. Khvat, I. Okun, D. Petersen, and S. Krauss, 2011, A Novel Synthetic Smoothed Antagonist Transiently Inhibits Pancreatic Adenocarcinoma Xenografts in a Mouse Model.
- Strobel, O., D. E. Rosow, E. Y. Rakhlin, G. Y. Lauwers, A. G. Trainor, J. Alsina, C. Fernandez-Del Castillo, A. L. Warshaw, and S. P. Thayer, 2010, Pancreatic Duct Glands Are Distinct Ductal Compartments That React to Chronic Injury and Mediate Shh-Induced Metaplasia: *Gastroenterology*, v. 138.
- Taipale, J., J. K. Chen, M. K. Cooper, B. L. Wang, R. K. Mann, L. Milenkovic, M. P. Scott, and P. A. Beachy, 2000, Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine: *Nature*, v. 406.
- Thayer, S. P., M. P. di Magliano, P. W. Heiser, C. M. Nielsen, D. J. Roberts, G. Y. Lauwers, Y. P. Qi, S. Gysin, C. F. Fernandez-del Castillo, V. Yajnik, B. Antoniu, M. McMahon, A. L. Warshaw, and M. Hebrok, 2003, Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis: *Nature*, v. 425, p. 851-856.
- Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. J. Huang, and M. Angela Nieto, 2009, Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease: *Cell*, v. 139.
- Thompson, M. C., C. Fuller, T. L. Hogg, J. Dalton, D. Finkelstein, C. C. Lau, M. Chintagumpala, A. Adesina, D. M. Ashley, S. J. Kellie, D. T. Michael, T. Curran, A. Gajjar, and R. J. Gilbertson, 2006, Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations: *Journal of Clinical Oncology*, v. 24.
- Tian, H., C. A. Callahan, K. J. DuPree, W. C. Darbonne, C. P. Ahn, S. J. Scales, and F. J. de Sauvage, 2009, Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106.
- Tremblay, M. R., A. Lescarbeau, M. J. Grogan, E. Tan, G. Lin, B. C. Austad, L.-C. Yu, M. L. Behnke, S. J. Nair, M. Hagel, K. White, J. Conley, J. D. Manna, T. M. Alvarez-Diez, J. Hoyt, C. N. Woodward, J. R. Sydor, M. Pink, J. MacDougall, M. J. Campbell, J. Cushing, J. Ferguson, M. S. Curtis, K. McGovern, M. A. Read, V. J. Palombella, J. Adams, and A. C. Castro,

- 2009, Discovery of a Potent and Orally Active Hedgehog Pathway Antagonist (IPI-926): *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52.
- Verdoodt, B., I. Charlette, B. Maillet, and M. Kirsch-Volders, 1997, Numerical aberrations of chromosomes 1 and 17 in tumor cell lines of the exocrine pancreas as determined by fluorescence in situ hybridization: *Cancer Genetics and Cytogenetics*, v. 94.
- Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele, and Z. N. Berneman, 2005, Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer: *Annals of Hematology*, v. 84.
- Vistejnova, L., J. Dvorakova, M. Hasova, T. Muthny, V. Velebny, K. Soucek, and L. Kubala, 2009, The comparison of impedance-based method of cell proliferation monitoring with commonly used metabolic-based techniques: *Neuroendocrinology Letters*, v. 30.
- Wang, Y., Z. Zhou, C. T. Walsh, and A. P. McMahon, 2009, Selective translocation of intracellular Smoothed to the primary cilium in response to Hedgehog pathway modulation: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106.
- Watkins, D. N., D. M. Berman, S. G. Burkholder, B. L. Wang, P. A. Beachy, and S. B. Baylin, 2003, Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer: *Nature*, v. 422.
- Winter, J. M., J. L. Cameron, K. A. Campbell, M. A. Arnold, D. C. Chang, J. Coleman, M. B. Hodgins, P. K. Sauter, R. H. Hruban, T. S. Riall, R. D. Schulick, M. A. Choti, K. D. Lillemoe, and C. J. Yeo, 2006, 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience: *Journal of Gastrointestinal Surgery*, v. 10, p. 1199-1210.
- Wong, H., B. Alicke, K. A. West, P. Pacheco, H. La, T. Januario, R. L. Yauch, F. J. de Sauvage, and S. E. Gould, 2011, Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Analysis of Vismodegib in Preclinical Models of Mutational and Ligand-Dependent Hedgehog Pathway Activation: *Clinical Cancer Research*, v. 17.
- Xia, Y. P., R. L. Dai, Y. N. Li, L. Mao, Y. M. Xue, Q. W. He, M. Huang, Y. Huang, Y. W. Mei, and B. Hu, 2012, THE PROTECTIVE EFFECT OF SONIC HEDGEHOG IS MEDIATED BY THE PROPIDIUM IODIDE 3-KINASE/AKT/BCL-2 PATHWAY IN CULTURED RAT ASTROCYTES UNDER OXIDATIVE STRESS: *Neuroscience*, v. 209.
- Xie, J. W., M. Murone, S. M. Luoh, A. Ryan, Q. M. Gu, C. H. Zhang, J. M. Bonifas, C. W. Lam, M. Hynes, A. Goddard, A. Rosenthal, E. H. Epstein, and F. J. de Sauvage, 1998, Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma: *Nature*, v. 391.
- Xu, M., L. Li, Z. Liu, Z. Jiao, P. Xu, X. Kong, H. Huang, and Y. Zhang, 2013, ABCB2 (TAP1) as the downstream target of SHH signaling enhances pancreatic ductal adenocarcinoma drug resistance: *Cancer Letters*, v. 333, p. 152-158.
- Xu, X.-F., C.-Y. Guo, J. Liu, W.-J. Yang, Y.-J. Xia, L. Xu, Y.-C. Yu, and X.-P. Wang, 2009, Gli1 maintains cell survival by up-regulating IGFBP6 and Bcl-2 through promoter regions in parallel manner in pancreatic cancer cells: *Journal of carcinogenesis*, v. 8, p. 13.
- Yang, S.-H., C.-H. Hsu, J.-C. Lee, Y.-W. Tien, S.-H. Kuo, and A.-L. Cheng, 2013, Nuclear Expression of Glioma-Associated Oncogene Homo log 1 and Nuclear Factor-kappa B Is Associated with a Poor Prognosis of Pancreatic Cancer: *Oncology*, v. 85, p. 86-94.
- Yang, Y., X. Tian, X. Xie, Y. Zhuang, W. Wu, and W. Wang, 2010, Expression and regulation of hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer: *Langenbecks Archives of Surgery*, v. 395.
- Yao, J., Y. An, J.-s. Wei, Z.-l. Ji, Z.-p. Lu, J.-l. Wu, K.-r. Jiang, P. Chen, Z.-k. Xu, and Y. Miao, 2011, Cyclopamine reverts acquired chemoresistance and down-regulates cancer stem cell markers in pancreatic cancer cell lines: *Swiss Medical Weekly*, v. 141.
- Yauch, R. L., S. E. Gould, S. J. Scales, T. Tang, H. Tian, C. P. Ahn, D. Marshall, L. Fu, T. Januario, D. Kallop, M. Nannini-Pepe, K. Kotkow, J. C. Marsters, Jr., L. L. Rubin, and F. J. de Sauvage, 2008, A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer: *Nature*, v. 455.
- Yoon, J. W., R. Gilbertson, S. Iannaccone, P. Iannaccone, and D. Walterhouse, 2009, Defining a role for Sonic hedgehog pathway activation in desmoplastic medulloblastoma by identifying GLI1 target genes: *International Journal of Cancer*, v. 124, p. 109-119.

- Yuan, Z., J. A. Goetz, S. Singh, S. K. Ogden, W. J. Petty, C. C. Black, V. A. Memoli, E. Dmitrovsky, and D. J. Robbins, 2007, Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma: *Oncogene*, v. 26.
- Zhang, X., N. Harrington, R. C. Moraes, M.-F. Wu, S. G. Hilsenbeck, and M. T. Lewis, 2009, Cyclopamine inhibition of human breast cancer cell growth independent of Smoothened (Smo): *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 115, p. 505-521.

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung der Hedgehog-Signalkasade, S. 13
- Abb. 2: Wege der Hedgehog-Aktivierung, S. 16
- Abb. 3: Tumorstroma, S. 19
- Abb. 4: Strukturformel von NVP-LDE225, S.22
- Abb. 5: Funktionsprinzip des xCELLigence Systems, S. 38
- Abb. 6: Zweigipfliges Histogramm nach FACS-Analyse, S. 41
- Abb. 7: Manuelle Zellzählung Capan-1, S. 51
- Abb. 8: Manuelle Zellzählung Panc-1, S. 52
- Abb. 9: xCELLigence wt-Capan-1, Monotherapie mit LDE225, S. 53
- Abb. 10: xCELLigence GR-Capan-1, Monotherapie mit LDE225, S. 54
- Abb. 11: xCELLigence wt-Panc-1, Monotherapie mit LDE225, S. 55
- Abb. 12: xCELLigence GR-Panc-1, Monotherapie mit LDE225, S. 55
- Abb. 13: xCELLigence GR-Capan-1, Mono- vs. Kombinationstherapie, S. 57
- Abb. 14: xCELLigence GR-Panc-1, Mono- vs. Kombinationstherapie, S. 57
- Abb. 15: xCELLigence, DMSO vs. unbehandelte Kontrolle, S. 58
- Abb. 16: FACS, subG1-Fraktion Capan-1 wt und GR, S. 59
- Abb. 17: FACS, subG1-Fraktion Panc-1 wt und GR, S. 60
- Abb. 18: FACS wt-Capan-1 bei 72h, S. 61
- Abb. 19: FACS GR-Capan-1 bei 72h, S. 62
- Abb. 20: FACS wt-Panc-1 bei 72h, S. 63
- Abb. 21: FACS GR-Panc-1 bei 72h, S. 64
- Abb. 22: FACS GR-Panc-1, Mono- vs. Kombinationstherapie, S. 65
- Abb. 23: qPCR Capan-1 und Panc-1, Baseline-Genexpression, S. 66
- Abb. 24: qPCR Capan-1 wt und GR, Genexpression bei 24 – 96 h, S. 68
- Abb. 25: qPCR Panc-1 wt und GR, Genexpression bei 24 – 96 h, S. 69
- Abb. 26: Western Blot-Analyse wt- und GR-Capan-1 und -Panc-1, Proteinexpression bei 24 – 96 h, S. 71

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Geräte, S. 26
Tab. 2:	Kits, S. 28
Tab. 3:	Software, S. 29
Tab. 4:	Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturbedarf, S. 29
Tab. 5:	Kulturmedien, S. 30
Tab. 6:	Puffer und Lösungen, S. 31
Tab. 7:	Primer, S. 32
Tab. 8:	Primärantikörper, S. 33
Tab. 9:	Sekundärantikörper, S. 34
Tab. 10:	In den Versuchen zur Proliferation verwendete Wirkstoffe und Konzentrationen, S. 39
Tab. 11:	In FACS-Experimenten verwendete Konzentrationen von LDE225 und Gemcitabin, S. 40
Tab. 12:	Themperaturzyklus der cDNA-Synthese, S. 43
Tab. 13:	Bestandteile der für die PCR benötigten Reagenzien, S. 44
Tab. 14:	Arbeitsschritte der qPCR, S. 45
Tab. 15:	im xCELLigence ermittelte IC_{50} und Verdopplungszeit, S. 52
Tab. S1-19:	Supplementäre Tabellen & Übersicht der Ergebnisse, S. 104-116

8.3 Abkürzungsverzeichnis

AA/BA	Acrylamid/Bis-acrylamid
a.b.	Aqua bidestillata (zweifach destilliertes Wasser)
ABC	ATP-binding cassette (membranständiges Transportprotein)
aCGH	array comparative genomic hybridization (Genomische Untersuchungen)
APS	Ammoniumpersulfat
aq. dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ATCC	American Type Culture Collection (Amerikanische Sammlung für Zelllinien)
BCA-Assay	Bicinchoninsäure-Assay
BCC	Basalzellkarzinom
CI	Zellindex
ccm	Kubikzentimeter [Einheit]
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNA)
CSC	Cancer stem cells (Krebsstammzellen)
Cq	Quantification cycle (Kenngröße zur Genquantifizierung bei der qPCR)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (Rezeptor-Tyrosinkinase)
ELISA	Enzyme linked immuno-sorbent assay (Enzymgekoppelter Immunoassay)
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FBS	Fetal bovine serum (Fötales Kälberserum)
G1, G2, G3	Grad der Differenzierung des PDAC; je höher, desto schlechter differenziert
IC ₅₀	Halbmaximale inhibitorische Konzentration (je nach Kontext bzgl. Proliferation oder des Anteils der inhibierten SMO-Moleküle)
Hh	Hedgehog-Signalweg
Ihh	Indian Hedgehog-Signalweg
IHH	Indian Hedgehog-Ligandenprotein
Dhh	Desert Hedgehog-Signalweg
DHH	Desert Hedgehog-Ligandenprotein

GLI1	Glioma-associated oncogene 1
GOF	Gain of function (Funktionszunahme eines Onkogens, z.B. durch LOH)
GR	Gemcitabin-resistente Zellen (GR-Zellen; GR-Variante; GR-Modell)
LOF	Loss of function (Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens, z.B. infolge eines LOH)
LOH	Loss of heterozygosity (Verlust der Heterozygotie eines Genotyps, z.B. infolge einer Mutation)
MW	Mittelwert
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas
PDG	Pancreatic duct gland (Endständige azinäre Drüsen der Pankreasgänge)
PI	Propidium-Iodid-Lösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTCH	Membranprotein Patched
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
Shh	Sonic Hedgehog-Signalweg
SHH	Sonic Hedgehog-Ligandenprotein
SMO	Membranprotein Smoothed
SQ	Starting quantity (Menge an RNA zu Beginn der qPCR; dimensionslos)
TBST	Tris-buffered saline and Tween 20 (Tensid)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Signalmolekül der Angiogenese)
wt	wildtyp (Gemcitabin-sensitiv)

8.4 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse

Tab. S1			[Zellzahl/10 µl]		
a) Wachstumskurve GR-Capan-1 10µM resistent					
Zeit [h]	Probe	Kontrolle	LDE 100 µM	LDE 50 µM	LDE 10 µM
24h	1	10,50	2,50	6,75	7,25
	2	9,50	2,00	3,00	7,75
	3	9,75	3,25	7,25	10,00
	MW	9,92	2,58	5,67	8,33
	SD 1-3	0,52	0,63	2,32	1,46
	Rel.	1,00	0,26	0,57	0,84
	Rel. GR/wt	0,63	0,16	0,36	0,53
48h	1	15,75	3,25	11,75	11,25
	2	13,50	4,50	6,00	9,50
	3	15,00	4,50	9,75	14,75
	MW	14,75	4,08	9,17	11,83
	SD 1-3	1,15	0,72	2,92	2,67
	Rel.	1,00	0,28	0,62	0,80
	Rel. GR/wt	0,62	0,17	0,39	0,50
72h	1	26,25	3,75	12,00	19,25
	2	31,75	4,50	16,00	23,00
	3	25,75	4,00	13,75	22,75
	MW	27,92	4,08	13,92	21,67
	SD 1-3	3,33	0,38	2,01	2,10
	Rel.	1,00	0,15	0,50	0,78
	Rel. GR/wt	1,02	0,15	0,51	0,79
96h	1	31,25	7,00	11,50	24,75
	2	33,25	7,50	10,50	24,00
	3	25,75	9,00	16,25	28,25
	MW	30,08	7,83	12,75	25,67
	SD 1-3	3,88	1,04	3,07	2,27
	Rel.	1,00	0,26	0,42	0,85
	Rel. GR/wt	0,92	0,24	0,39	0,78
b) Wachstumskurve wt-Capan-1:				[Zellzahl/10 µl]	
	Probe	Kontrolle	LDE 100 µM	LDE 50 µM	LDE 10µM
24h	1	14,50	2,75	15,50	13,50
	2	17,50	4,75	12,75	15,25
	3	15,25	4,25	7,75	13,50
	MW	15,75	3,92	12,00	14,08
	SD 1-3	1,56	1,04	3,93	1,01
	Rel.	1,00	0,25	0,76	0,89
48h	1	25,25	3,50	9,25	20,25
	2	23,75	2,25	9,00	22,00
	3	22,00	4,00	12,75	22,00
	MW	23,67	3,25	10,33	21,42
	SD 1-3	1,63	0,90	2,10	1,01
	Rel.	1,00	0,14	0,44	0,90

72h		Kontrolle	LDE 100 µM	LDE 50 µM	LDE 10 µM
	1	26,00	5,50	11,00	20,25
	2	27,50	5,75	9,00	17,00
	3	29,00	5,25	10,25	20,25
	MW	27,50	5,50	10,08	19,17
	SD 1-3	1,50	0,25	1,01	1,88
	Rel.	1,00	0,20	0,37	0,70
96h	1	34,25	4,75	11,75	17,75
	2	32,50	6,00	9,75	20,25
	3	31,50	8,25	12,00	25,00
	MW	32,75	6,33	11,17	21,00
	SD 1-3	1,39	1,77	1,23	3,68
	Rel.	1,00	0,19	0,34	0,64

Tab. S2 Wachstumskurve wt-Panc-1:			Zellzahl/10 µl		
Zeit [h]	Probe	Kontrolle	LDE 100 µM	LDE 50µM	LDE 10µM
24h	1,00	3,50	0,00	0,25	2,50
	2,00	3,33	0,00	0,00	2,25
	3,00	2,50	0,25	0,25	4,50
	MW	3,11	0,08	0,17	3,08
	Zellzahl insg.	77750,00	2083,33	4166,67	77083,33
	SD 1-3	0,54	0,14	0,14	1,23
	SD total cells	1,34E+04	3,61E+03	3,61E+03	3,08E+04
	Rel.	1,00	0,03	0,05	0,99
48h	1	8,00	0,25	0,75	5,75
	2	5,75	0,00	0,50	2,00
	3	6,50	0,25	0,50	4,00
	MW	6,75	0,17	0,58	3,92
	Zellzahl insg.	168750,00	4166,67	14583,33	97916,67
	SD 1-3	1,15	0,14	0,14	1,88
	SD total cells	2,86E+04	3,61E+03	3,61E+03	4,69E+04
	Rel.	1,00	0,02	0,09	0,58
72h	1	8,50	0,50	0,00	6,75
	2	9,00	0,00	0,00	7,25
	3	7,50	0,00	0,75	9,25
	MW	8,33	0,17	0,25	7,75
	Zellzahl insg.	208333,33	4166,67	6250,00	193750,00
	SD 1-3	0,76	0,29	0,43	1,32
	SD total cells	1,91E+04	7,22E+03	1,08E+04	3,31E+04
	Rel.	1,00	0,02	0,03	0,93
96h	1	37,25	0,50	0,25	25,75
	2	32,00	0,00	0,25	21,50
	3	19,00	0,00	0,25	24,50
	MW	29,42	0,17	0,25	23,92
	Zellzahl insg.	735416,67	4166,67	6250,00	597916,67
	SD 1-3	9,40E+00	2,89E-01	0,00E+00	2,18E+00
	SD total cells	2,35E+05	7,22E+03	0,00E+00	5,46E+04
	Rel.	1,00	0,01	0,01	0,81

Tab. S3 xCELLigence wt-Capan-1, Kontrolle vs. LDE			Experiment ID: 1011091814		Normalisierungszeit: 19:00:31			
Zeitintervall [h]	Kontrolle	Kontrolle SD	100 µM LDE	100 µM SD	50 µM LDE	50 µM SD	10 µM LDE	10 µM SD
0	1	0	1	0	1	0	1	0
6	1,1229	0,026	0,446	0,0515	0,8364	0,0187	0,9458	0,0601
12	1,2493	0,0404	0,3974	0,0572	0,8063	0,0769	0,9852	0,0967
18	1,5716	0,0821	0,4388	0,0728	0,9124	0,1253	1,1476	0,1066
24	2,0858	0,157	0,4906	0,087	1,0584	0,1735	1,3712	0,0845
30	2,8186	0,1846	0,5896	0,0916	1,2989	0,3128	1,8045	0,0498
36	3,4703	0,1889	0,6759	0,1023	1,5537	0,4558	2,2619	0,137
42	4,1523	0,2918	0,7158	0,1099	1,7171	0,5053	2,7274	0,2243
48	4,8184	0,3502	0,7792	0,1489	1,9148	0,5174	3,3566	0,3314
54	5,525	0,4623	0,8729	0,1648	2,1499	0,5683	3,9794	0,4312
60	5,9705	0,5686	1,0079	0,1719	2,4912	0,7032	4,6473	0,6395
66	6,2961	0,6547	1,1715	0,2018	2,8434	0,7931	5,2214	0,7871
72	6,242	0,9915	1,3318	0,2258	3,1176	0,8037	5,8232	0,7692
Replik @72 h	Kontrolle	100 µM LDE	50 µM LDE	10 µM LDE				
1	7,3499	1,1335	2,1914	6,5989				
2	5,4378	1,1721	3,5310	5,8101				
3	5,9385	1,6204	-	5,0606				
4	-	1,4010	3,6305	-				
p=		0,0110	0,0145	0,5960				

Tab. S4 xCELLigence GR-Capan-1, Kontrolle vs. LDE			Experiment ID: 1102141809		Normalisierungszeit: 22:12:13			
Zeitintervall [h]	Kontrolle	Kontrolle SD	100 µM LDE	100 µM SD	50 µM LDE	50 µM SD	10 µM LDE	10 µM SD
0	1	0	1	0	1	0	1	0
6	1,5554	0,1164	1,2603	0,0842	1,1468	0,0889	1,7539	0,3851
12	1,8539	0,1421	1,0985	0,0482	1,1265	0,0941	2,0302	0,4383
18	2,2068	0,1996	1,2348	0,0523	1,2152	0,0958	2,5534	0,6223
24	2,6349	0,2673	1,4737	0,0681	1,3798	0,1275	3,1927	0,8386
30	3,1206	0,2982	1,6248	0,0743	1,5231	0,1043	3,7443	1,0174
36	3,6211	0,3484	1,7356	0,0737	1,6169	0,1264	4,4357	1,2549
42	4,2511	0,4351	1,8923	0,0842	1,6865	0,2465	5,3388	1,6065
48	4,9906	0,4765	2,1091	0,0822	1,8391	0,2888	6,5006	2,0985
54	5,8289	0,4846	2,3717	0,0918	2,0619	0,3114	7,4145	2,3642
60	6,3904	0,9207	2,6257	0,1005	2,2768	0,3763	7,8883	2,2515
66	7,4546	0,9033	2,8969	0,1191	2,4937	0,449	7,7955	2,2725
72	7,7841	1,1519	3,1863	0,145	2,7596	0,4479	7,2166	2,6914
Replik @ 72 h	Kontrolle	100 µM LDE	50 µM LDE	10 µM LDE				
1	9,1748	3,2729	3,2301	7,7279				
2	8,1836	2,6528	3,0245	9,2958				
3	6,5121	2,9059	3,3044	8,5472				
4	7,2658	2,2067	-	-				
p=		0,0014	0,0036	0,3591				

Tab. S5 xCELLigence wt-Panc-1, Kontrolle vs. LDE				Experiment ID: 1105051445		Normalisierungszeit: 20:16:06		
Zeitintervall [h]	Kontrolle	Kontrolle SD	100 µM LDE	100 µM SD	50 µM LDE	50 µM SD	10 µM LDE	10 µM SD
0	1	0	1	0	1	0	1	0
6	0,7116	0,0511	0,427	0,0405	0,757	0,0332	0,7904	0,065
12	0,7539	0,0643	0,2928	0,0389	0,5641	0,0285	0,7359	0,0785
18	0,8641	0,0816	0,2232	0,0361	0,4448	0,0226	0,7342	0,0818
24	1,0325	0,1087	0,1944	0,0334	0,4033	0,0083	0,8416	0,0695
30	1,2085	0,137	0,1929	0,0262	0,4006	0,0181	0,9921	0,0814
36	1,4865	0,1657	0,1972	0,0305	0,4225	0,0227	1,1654	0,099
42	1,9802	0,2059	0,2077	0,0294	0,4421	0,0242	1,4323	0,1258
48	2,567	0,273	0,2181	0,0318	0,4753	0,0219	1,8063	0,157
54	3,237	0,3513	0,2399	0,0368	0,5301	0,024	2,3407	0,2226
60	4,1674	0,4405	0,2743	0,0393	0,604	0,036	3,0203	0,372
66	5,1588	0,5206	0,3238	0,0445	0,7093	0,0712	3,7915	0,5235
72	5,999	0,5278	0,3822	0,0376	0,8562	0,0858	4,6283	0,68
Replikate @ 72 h	Kontrolle	50 µM LDE	30 µM LDE	10 µM LDE				
1	5,4800	0,3600	0,9409	4,0895				
2	5,7586	0,3611	0,8583	5,5943				
3	6,0470	0,4256	0,7693	4,2246				
4	6,7104	-	-	4,6048				
p=		0,0002	0,0002	0,0206				

Tab. S6 xCELLigence GR-Panc-1, Kontrolle vs. LDE				Experiment ID: 1105051445		Normalisierungszeit: 20:31:06		
Zeitintervall [h]	Kontrolle	Kontrolle SD	100 µM LDE	100 µM SD	50 µM LDE	50 µM SD	10 µM LDE	10 µM SD
0	1	0	1	0	1	0	1	0
6	0,9634	0,0553	0,6008	0,046	0,8024	0,035	1,0736	0,0175
12	0,9823	0,0425	0,4396	0,0524	0,6268	0,037	1,0251	0,0227
18	0,9842	0,0673	0,3345	0,0533	0,4898	0,0553	0,9432	0,0236
24	1,041	0,0644	0,2755	0,052	0,4039	0,0631	0,9267	0,0163
30	1,1275	0,0798	0,2398	0,0491	0,3467	0,0652	0,933	0,0133
36	1,2242	0,0858	0,2225	0,0527	0,315	0,0732	0,9607	0,02
42	1,3557	0,0907	0,2094	0,0508	0,3013	0,0777	0,9845	0,0325
48	1,4848	0,0986	0,2003	0,0532	0,294	0,0851	1,0424	0,025
54	1,6276	0,082	0,1984	0,0569	0,2948	0,0933	1,1263	0,0086
60	1,7602	0,0608	0,1947	0,0597	0,299	0,0929	1,198	0,0251
66	1,9504	0,0783	0,1938	0,0601	0,305	0,1007	1,2893	0,0359
72	2,1104	0,0801	0,1977	0,0675	0,3169	0,1102	1,3954	0,0364
Replikate @ 72 h	Kontrolle	50 µM LDE	30 µM LDE	10 µM LDE				
1	2,0535	0,2972	0,4793	1,3901				
2	2,2021	0,1511	0,2849	1,3688				
3	2,0756	0,1612	0,2360	1,3745				
4	-	0,1814	0,2672	1,4483				
p=		0,0000	0,0000	0,0014				

Tab. S7 xCELLigence GR-Capan-1 LDE Mono vs. LDE+Gemc. Kombi			Experiment ID: 1102141809		Normalisierungszeit: 22:01:11	
Zeitintervall [h]	Kontrolle	Kontrolle SD	50 µM LDE	50µM SD	50 µM LDE + 10 µM Gemc.	LDE + Gemc. SD
0	1	0	1	0	1	0
6	1,4362	0,1482	0,9762	0,0896	1,2393	0,1352
12	1,7095	0,1421	0,9451	0,0931	1,0574	0,1168
18	2,0609	0,1184	1,1289	0,0833	1,2014	0,1362
24	2,4972	0,1224	1,3145	0,0962	1,451	0,1717
30	2,9315	0,1448	1,4874	0,1154	1,618	0,2082
36	3,3516	0,1635	1,6597	0,1533	1,7343	0,227
42	3,8989	0,1276	1,8017	0,16	1,9012	0,2682
48	4,5192	0,026	1,9717	0,1839	2,1394	0,3266
54	5,171	0,1733	2,0938	0,1712	2,4166	0,373
60	5,2416	0,8216	2,2862	0,2299	2,7039	0,4529
66	6,1231	0,3156	2,6131	0,3012	2,9941	0,5197
72	6,8815	0,5681	2,918	0,3119	3,2861	0,5589
Replikat @ 72 h	Kontrolle	LDE 50 µM	LDE+Gem			
1	-	3,0944	2,6368			
2	7,2832	3,1095	3,3628			
3	-	2,8373	2,8641			
4	6,4798	4,1032	2,8082			
p=		0,01700788	0,03748016			

Tab. S8 xCELLigence GR-Panc-1 LDE Mono vs. LDE+Gemc. Kombi			Experiment ID: 1105051445		Normalisierungszeit: 21:09:13	
Zeitintervall [h]	Kontrolle	Kontrolle SD	10 µM LDE	10µM LDE SD	10 µM LDE + 1µM Gemc.	LDE + Gemc. SD
0	1	0	1	0	1	0
6	1,2849	0,0253	1,5232	0,1066	1,568	0,1897
12	1,3013	0,0612	1,4354	0,0855	1,6197	0,1934
18	1,3178	0,0437	1,3224	0,0601	1,6075	0,1801
24	1,3954	0,0787	1,3075	0,0673	1,6307	0,1909
30	1,5107	0,0801	1,324	0,0801	1,6527	0,1825
36	1,6427	0,0662	1,3621	0,0971	1,7015	0,1615
42	1,8292	0,0977	1,3951	0,1103	1,7675	0,1258
48	1,9949	0,1032	1,4828	0,1031	1,8231	0,1093
54	2,1789	0,1461	1,5983	0,1037	1,8704	0,0919
60	2,3727	0,1527	1,7007	0,0957	1,9254	0,0808
66	2,6307	0,2008	1,829	0,1227	1,9543	0,0738
72	2,8347	0,2239	1,9844	0,1415	1,9563	0,0792
Replikat @ 72 h	Kontrolle	LDE 30 µM	LDE+Gemc.			
1	2,5766	1,8043	2,0584			
2	2,9511	2,0068	1,8665			
3	2,9763	1,9775	1,9393			
4	-	2,1491	1,9609			
p=		0,0087	0,0145			

Tab. S9 xCELLigence, Kontrolle vs. DMSO									
Experiment ID (Capan-1): 1102141809 Experiment ID (Panc-1): 1105051445					Normalisierung (Capan-1): 22:12:13 Normalisierung(Panc-1): 20:35:12				
a) wt-Capan-1					b) GR-Capan-1				
Zeit [h]	Kontrolle	Kontrolle SD	0,5% DMSO	DMSO SD	Zeit [h]	Kontrolle	Kontrolle SD	0,5% DMSO	DMSO SD
0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
6	1,4277	0,0248	1,3753	0,0516	6	1,5613	0,1176	1,4323	0,1036
12	1,6001	0,0451	1,6357	0,0645	12	1,8584	0,1424	1,7672	0,1108
18	2,0114	0,0864	2,1094	0,0794	18	2,2068	0,1996	2,1366	0,1188
24	2,6482	0,2108	2,7434	0,2014	24	2,6349	0,2673	2,6061	0,1547
30	3,5175	0,2966	3,5494	0,4591	30	3,1206	0,2982	3,1196	0,2059
36	4,3117	0,3272	4,3041	0,6288	36	3,6211	0,3484	3,6649	0,3186
42	5,1221	0,4067	5,0547	0,7646	42	4,2511	0,4351	4,3268	0,5923
48	6,0223	0,4522	5,9697	0,8504	48	4,9906	0,4765	5,1366	0,9183
54	6,858	0,5423	6,8284	0,8481	54	5,8289	0,4846	6,2264	1,3731
60	7,397	0,6192	7,504	0,8782	60	6,3904	0,9207	7,2006	1,564
66	7,5501	0,972	7,9851	0,8541	66	7,4546	0,9033	8,1112	1,7673
72	7,2506	1,6	8,1462	1,2001	72	7,7841	1,1519	8,4698	2,4637
c) wt-Panc-1					d) GR-Panc-1				
Zeit [h]	Kontrolle	Kontrolle SD	0,25% DMSO	DMSO SD	Zeit [h]	Kontrolle	Kontrolle SD	0,25% DMSO	DMSO SD
0	1	0	1	0	0	1	0	1	0
6	1,073	0,037	1,0273	0,0487	6	1,0909	0,047	1,0829	0,053
12	1,1337	0,0526	1,1547	0,0519	12	1,1119	0,0367	1,1226	0,0549
18	1,3152	0,0683	1,3937	0,0856	18	1,115	0,0643	1,1352	0,0778
24	1,5522	0,0941	1,6616	0,0968	24	1,1805	0,0645	1,2046	0,0699
30	1,8278	0,1299	1,991	0,1369	30	1,2771	0,0807	1,3182	0,0635
36	2,2619	0,1544	2,567	0,1898	36	1,3864	0,0822	1,4545	0,0605
42	3,0108	0,2054	3,2724	0,2191	42	1,5369	0,0912	1,6165	0,0857
48	3,8951	0,2863	4,1699	0,352	48	1,6845	0,0985	1,796	0,121
54	4,9285	0,4532	5,4093	0,4686	54	1,8441	0,0837	2,0112	0,1479
60	6,3423	0,6993	6,6883	0,4884	60	1,9938	0,062	2,206	0,1764
66	7,8502	0,8837	7,9265	0,549	66	2,2144	0,0903	2,4196	0,2226
72	9,097	1,0591	9,2076	0,6608	72	2,3915	0,1014	2,6304	0,2272

Tab. S10 FACS subG1-Fraktion 24-96 h [%]												
	Kontrolle		LDE					Kontrolle		LDE		
Zeit	MW	SD	MW	SD	p=		Zeit	MW	SD	MW	SD	p=
a) wt-Capan-1 (50 µM LDE)							b) GR-Capan-1 (50 µM LDE)					
24 h	6,40	1,37	5,76	0,21	0,51		24 h	10,74	2,65	12,97	1,93	0,31
48 h	2,31	0,95	4,19	0,25	0,07		48 h	3,67	0,40	4,23	0,69	0,31
72 h	4,33	0,96	4,73	0,90	0,63		72 h	6,51	0,50	7,26	0,63	0,18
96 h	5,95	0,32	6,46	1,61	0,64		96 h	4,23	1,77	6,66	1,06	0,13
c) wt-Panc-1 (30 µM LDE)							d) GR-Panc-1 (30 µM LDE)					
24 h	11,00	0,70	14,07	0,86	0,01		24 h	2,22	1,06	2,56	1,07	0,53
48 h	19,20	2,42	21,30	1,97	0,31		48 h	4,74	0,67	3,55	1,21	0,23
72 h	15,67	1,63	25,50	3,30	0,02		72 h	4,52	0,32	7,65	0,52	0,002
96 h	15,87	1,61	26,43	6,98	0,11		96 h	3,09	0,63	5,23	1,17	0,07

Tab. S11 FACS @ 72 h [%]												
	Kontrolle		Gemcitabin Mono			LDE Mono			Kombi LDE+Gemc.			
	MW	SD	MW	SD	p=	MW	SD	p=	MW	SD	p=	
a) wt-Capan-1												
subG1	4,18	2,04	3,44	1,39	0,64	4,53	1,18	0,81	3,74	0,85	0,76	
G1	60,60	2,67	41,03	3,80	< 0,001	60,87	3,92	0,93	54,20	6,94	0,25	
S	22,10	1,31	58,30	7,27	0,01	22,57	2,32	0,78	43,07	13,70	0,12	
G2	13,10	1,93	0,49	0,69	< 0,001	12,87	2,11	0,89	2,36	3,72	0,02	
b) GR-Capan-1												
subG1	6,01	1,31	9,74	0,77	0,02	5,87	0,46	0,87	6,91	1,20	0,43	
G1	56,70	3,05	54,03	2,56	0,31	64,37	1,65	0,03	69,13	1,70	0,01	
S	24,93	1,62	26,40	1,06	0,27	21,97	1,50	0,08	20,27	0,32	0,03	
G2	13,80	0,46	10,90	0,10	0,01	12,47	0,55	0,03	10,43	1,22	0,03	
c) wt-Panc-1												
subG1	6,19	1,53	21,33	0,67	< 0,001	10,20	0,72	0,03	8,67	2,28	0,20	
G1	41,07	2,12	12,73	1,35	< 0,001	38,63	0,32	0,18	22,93	2,00	< 0,001	
S	35,40	1,14	55,33	1,22	< 0,001	32,93	0,71	0,04	58,93	0,51	< 0,001	
G2	13,77	0,42	12,70	0,10	0,04	19,13	1,43	0,02	11,80	1,37	0,12	
d) GR-Panc-1												
subG1	4,52	0,32	6,28	0,98	0,08	7,65	0,52	< 0,001	6,31	0,93	0,07	
G1	29,13	0,86	17,47	0,76	< 0,001	19,60	0,92	< 0,001	17,60	1,56	< 0,001	
S	36,50	2,65	41,83	1,10	0,06	35,40	2,11	0,60	47,40	1,91	0,01	
G2	27,77	5,39	33,53	1,80	0,20	31,70	2,15	0,34	27,00	0,36	0,83	

Tab. S12 GR-Panc-1 FACS subG1-Fraktion 24-96 h [%]					
	LDE Mono		LDE + Gemc. Kombi		
	MW	SD	MW	SD	p=
24 h	1,06	1,07	1,42	1,63	> 0,05
48 h	3,55	1,21	4,44	1,82	> 0,05
72 h	7,65	0,52	6,31	0,93	> 0,05
96 h	5,23	1,17	6,00	1,10	> 0,05

Tab. S13 qPCR, Basline-Genexpression bei 0h														
a) Genexpression														
Gen ->	Probe	Expression	Exp. SD	Probe	Expression	Exp. SD		Gen ->	Probe	Expression	Exp. SD	Probe	Expression	Exp. SD
<i>GLI1</i>	GR-Panc-1	0,11	0,03	wt-Panc-1	1,00	0,38		<i>GLI1</i>	GR-Capan-1	0,48	0,04	wt-Capan-1	1,00	0,19
<i>PTCH1</i>	GR-Panc-1	1,16	0,08	wt-Panc-1	1,00	0,25		<i>PTCH1</i>	GR-Capan-1	0,40	0,05	wt-Capan-1	1,00	0,10
<i>SHH</i>	GR-Panc-1	2,14	0,49	wt-Panc-1	1,00	0,25		<i>SHH</i>	GR-Capan-1	0,06	0,01	wt-Capan-1	1,00	0,03
<i>SMO</i>	GR-Panc-1	0,30	0,04	wt-Panc-1	1,00	0,31		<i>SMO</i>	GR-Capan-1	3,78	0,37	wt-Capan-1	1,00	0,79
b) p-Werte														
Gen ->	<i>GAPDH</i>		<i>GLI1</i>			<i>PTCH1</i>			<i>SHH</i>			<i>SMO</i>		
	SQ	MW (GAPDH)	SQ(GLI1)	SQ(GLI1)/ MW(GAPDH)	p-Wert GR vs. wt	SQ(PTCH1)	SQ(PTCH1)/ MW(GAPDH)	p-Wert GR vs. wt	SQ(SHH)	SQ(SHH)/ MW(GAPDH)	p-Wert GR vs. wt	SQ(SMO)	SQ(SMO)/ MW(GAPDH)	p-Wert GR v wt
wt-Capan-1 #1	1,05	1,04	1,05	1,01		2,61	2,51		2,15	2,07		0,01	0,01	
wt-Capan-1 #2	1,04	1,04	1,03	0,99		2,69	2,58		2,22	2,13		0,05	0,05	
wt-Capan-1 #3	1,03	1,04	1,02	0,98		3,13	3,02		2,20	2,11		0,03	0,03	
GR-Capan-1 #1	1,18	1,19	2,49	2,10	0,011	1,18	0,99	0,005	3,39	2,85	0,018	0,67	0,56	0,001
GR-Capan-1 #2	1,11	1,19	2,53	2,13	0,011	1,19	1,01	0,005	3,54	2,98	0,018	0,76	0,64	0,001
GR-Capan-1 #3	1,27	1,19	2,99	2,52	0,011	1,38	1,16	0,005	3,11	2,62	0,018	0,80	0,67	0,001
wt-Panc-1 #1	2,28	2,01	2,36	1,17		2,49	1,24		6,47	3,22		4,29	2,14	
wt-Panc-1 #2	1,49	2,01	3,72	1,85		2,25	1,12		5,62	2,80		5,40	2,69	
wt-Panc-1 #3	2,25	2,01	2,37	1,18		2,58	1,28		6,70	3,34		5,73	2,85	
GR-Panc-1 #1	1,70	1,72	6,42	3,74	0,065	2,23	1,30	0,369	0,78	0,45	0,002	4,67	2,72	0,744
GR-Panc-1 #2	1,68	1,72	4,97	2,89	0,065	2,05	1,20	0,369	0,51	0,30	0,002	4,39	2,55	0,744
GR-Panc-1 #3	1,77	1,72	3,64	2,12	0,065	2,33	1,36	0,369	0,68	0,40	0,002	3,63	2,11	0,744

Tab. S14 qPCR - Genexpression Capan-1										
	Ctrl		24h		48h		72h		96h	
	Expression	Exp. SD	Expression	Exp. SD	Expression	Exp. SD	Expression	Exp. SD	Expression	Exp. SD
a) wt-Capan-1										
<i>GLI1</i>	1,00	0,02	0,54	0,05	0,61	0,05	0,53	0,13	0,72	0,11
<i>PTCH1</i>	1,00	0,10	0,69	0,04	0,41	0,04	0,29	0,02	0,17	0,01
<i>SMO1</i>	1,00	0,79	4,64	0,40	13,31	2,16	13,11	5,97	19,29	2,31
<i>SHH</i>	1,00	0,02	0,71	0,09	0,47	0,04	0,69	0,06	0,32	0,02
b) GR-Capan-1										
<i>GLI1</i>	1,00	0,12	0,90	0,11	0,82	0,10	1,06	0,12	2,79	0,36
<i>PTCH1</i>	1,00	0,11	0,96	0,10	0,95	0,09	0,77	0,02	1,22	0,08
<i>SMO1</i>	1,00	0,11	1,07	0,22	6,52	1,62	2,44	0,24	6,93	1,02
<i>SHH</i>	1,00	0,10	0,67	0,13	0,45	0,11	1,50	0,19	2,39	0,40

Tab. S17 qPCR - Genexpression Panc-1										
	Ctrl		24h		48h		72h		96h	
	Expression	Exp. SD	Expression	Exp. SD	Expression	Exp. SD	Expression	Exp. SD	Expression	Exp. SD
a) wt-Panc										
<i>GLI1</i>	1,00	0,36	0,86	0,16	1,20	0,16	1,06	0,28	0,51	0,05
<i>PTCH1</i>	1,00	0,25	0,70	0,12	0,98	0,14	0,91	0,13	0,59	0,04
<i>SMO1</i>	1,00	0,29	0,71	0,14	0,57	0,13	1,42	0,22	0,36	0,07
<i>SHH</i>	1,00	0,26	0,98	0,19	0,23	0,04	0,65	0,07	0,17	0,04
b) GR-Panc-1										
<i>GLI1</i>	1,00	0,29	0,80	0,14	0,69	0,11	0,45	0,07	0,64	0,02
<i>PTCH1</i>	1,00	0,07	0,72	0,13	1,31	0,08	1,01	0,18	0,72	0,03
<i>SMO1</i>	1,00	0,21	2,86	0,32	3,11	0,18	7,29	1,24	7,57	1,68
<i>SHH</i>	1,00	0,13	1,15	0,08	0,92	0,07	0,51	0,11	0,53	0,05

Tab. S15 qPCR - SQ- und p-Werte wt-Capan-1														
Gen ->	<i>GAPDH</i>		<i>GLI1</i>			<i>PTCH1</i>			<i>SHH</i>			<i>SMO</i>		
Probe	SQ	MW (GAPDH)	SQ(GLI1)	SQ(GLI1)/ MW(GAPDH)	p-Wert	SQ(PTCH1)	SQ(PTCH1)/ MW(GAPDH)	p-Wert	SQ(SHH)	SQ(SHH)/ MW(GAPDH)	p-Wert	SQ(SMO)	SQ(SMO)/ MW(GAPDH)	p-Wert
Ctrl #1	1,05	1,04	1,05	1,01		2,61	2,51		2,15	2,07		0,01	0,01	
Ctrl #2	1,04	1,04	1,03	0,99		2,69	2,58		2,22	2,13		0,05	0,05	
Ctrl #3	1,03	1,04	1,02	0,98		3,13	3,02		2,20	2,11		0,03	0,03	
24h #1	1,63	1,65	0,73	0,45	0,005	3,02	1,83	0,027	2,71	1,64	0,026	0,76	0,46	0,002
24h #2	1,61	1,65	0,77	0,47	0,005	3,00	1,82	0,027	2,60	1,58	0,026	0,86	0,52	0,002
24h #3	1,70	1,65	0,95	0,58	0,005	3,24	1,96	0,027	2,15	1,30	0,026	0,95	0,58	0,002
48h #1	1,58	1,55	0,90	0,58	0,000	1,58	1,02	0,006	1,59	1,03	0,000	4,28	2,76	0,022
48h #2	1,42	1,55	0,84	0,54	0,000	1,69	1,09	0,006	1,53	0,99	0,000	7,30	4,72	0,022
48h #3	1,64	1,55	0,90	0,58	0,000	1,84	1,19	0,006	1,48	0,96	0,000	6,43	4,16	0,022
72h #1	1,55	1,55	1,10	0,71	0,044	1,11	0,72	0,005	2,20	1,42	0,007	2,34	1,51	0,164
72h #2	1,57	1,55	0,66	0,42	0,044	1,26	0,81	0,005	2,13	1,37	0,007	5,86	3,77	0,164
72h #3	1,54	1,55	0,55	0,35	0,044	1,28	0,83	0,005	2,47	1,59	0,007	13,79	8,88	0,164
96h #1	1,66	1,61	1,25	0,77	0,166	0,73	0,45	0,005	1,02	0,63	0,000	16,89	10,47	0,018
96h #2	1,57	1,61	0,96	0,60	0,166	0,74	0,46	0,005	1,04	0,64	0,000	12,20	7,57	0,018
96h #3	1,60	1,61	1,54	0,95	0,166	0,70	0,43	0,005	1,16	0,72	0,000	10,92	6,77	0,018

Tab. S16 qPCR - SQ- und p-Werte GR-Capan-1														
Gen ->	<i>GAPDH</i>		<i>GLI1</i>			<i>PTCH1</i>			<i>SHH</i>			<i>SMO</i>		
Probe	SQ	MW	SQ	SQ(GLI1)/ SQ(GAPDH)	p-Wert	SQ	SQ(PTCH1)/ SQ(GAPDH)	p-Wert	SQ	SQ(SHH)/ SQ(GAPDH)	p-Wert	SQ	SQ(SMO)/ SQ(GAPDH)	p-Wert
Ctrl #1	1,18	1,19	2,49369	2,10		1,18	0,99		3,39	2,85		0,67	0,56	
Ctrl #2	1,11	1,19	2,52690	2,13		1,19	1,01		3,54	2,98		0,76	0,64	
Ctrl #3	1,27	1,19	2,98874	2,52		1,38	1,16		3,11	2,62		0,80	0,67	
24h #1	1,25	1,37	2,62054	1,91	0,254	1,39	1,02	0,488	2,48	1,81	0,027	0,80	0,58	0,577
24h #2	1,49	1,37	3,05451	2,23	0,254	1,30	0,95	0,488	2,18	1,59	0,027	0,30	0,22	0,577
24h #3	1,37	1,37	2,61510	1,91	0,254	1,43	1,05	0,488	3,12	2,27	0,027	1,04	0,76	0,577
48h #1	1,44	1,30	2,23291	1,72	0,072	1,26	0,97	0,416	1,52	1,17	0,004	6,88	5,29	0,026
48h #2	1,22	1,30	2,53102	1,95	0,072	1,28	0,98	0,416	1,36	1,05	0,004	4,75	3,65	0,026
48h #3	1,24	1,30	2,38	1,83	0,072	1,35	1,04	0,416	2,11	1,62	0,004	4,50	3,46	0,026
72h #1	0,96	0,98	2,15163	2,21	0,456	0,78	0,80	0,048	4,61	4,72	0,030	1,59	1,63	0,067
72h #2	0,99	0,98	2,50693	2,57	0,456	0,79	0,81	0,048	3,61	3,70	0,030	1,39	1,42	0,067
72h #3	0,98	0,98	2,33	2,39	0,456	0,81	0,83	0,048	4,22	4,32	0,030	0,93	0,96	0,067
96h #1	1,34	1,35	9,75208	7,21	0,009	1,68	1,25	0,034	8,66	6,40	0,025	6,39	4,72	0,008
96h #2	1,40	1,35	7,76246	5,74	0,009	1,86	1,37	0,034	10,95	8,09	0,025	6,35	4,69	0,008
96h #3	1,32	1,35	7,97172	5,89	0,009	1,67	1,23	0,034	7,92	5,85	0,025	4,96	3,66	0,008

Tab. S18 qPCR - SQ- und p-Werte wt-Panc-1														
Gen ->	<i>GAPDH</i>		<i>GLI1</i>			<i>PTCH1</i>			<i>SHH</i>			<i>SMO</i>		
Probe	SQ	MW	SQ	SQ(GLI1)/ SQ(GAPDH)	p-Wert	SQ	SQ(PTCH1)/ SQ(GAPDH)	p-Wert	SQ	SQ(SHH)/ SQ(GAPDH)	p-Wert	SQ	SQ(SMO)/ SQ(GAPDH)	p-Wert
Ctrl #1	2,28	2,01	2,36	1,17		2,49	1,24		6,47	3,22		4,29	2,14	
Ctrl #2	1,49	2,01	3,72	1,85		2,25	1,12		5,62	2,80		5,40	2,69	
Ctrl #3	2,25	2,01	2,37	1,18		2,58	1,28		6,70	3,34		5,73	2,85	
24h #1	2,69	2,65	3,17	1,20	0,469	2,43	0,92	0,008	8,39	3,17	0,915	4,31	1,63	0,058
24h #2	2,99	2,65	3,58	1,35	0,469	2,42	0,92	0,008	9,09	3,43	0,915	5,65	2,14	0,058
24h #3	2,26	2,65	2,77	1,05	0,469	2,02	0,76	0,008	7,04	2,66	0,915	4,58	1,73	0,058
48h #1	1,73	1,49	2,43	1,63	0,367	1,73	1,16	0,906	0,94	0,63	0,002	2,55	1,71	0,019
48h #2	1,36	1,49	2,58	1,73	0,367	1,83	1,23	0,906	1,19	0,80	0,002	1,75	1,17	0,019
48h #3	1,39	1,49	2,44	1,63	0,367	1,85	1,24	0,906	1,14	0,76	0,002	2,32	1,55	0,019
72h #1	2,45	2,42	3,24	1,34	0,776	2,87	1,19	0,362	4,79	1,98	0,018	9,92	4,10	0,028
72h #2	2,63	2,42	2,94	1,21	0,776	2,92	1,21	0,362	4,97	2,05	0,018	9,06	3,74	0,028
72h #3	2,18	2,42	4,72	1,95	0,776	2,42	1,00	0,362	5,12	2,12	0,018	7,82	3,23	0,028
96h #1	2,39	2,49	1,93	0,78	0,090	1,69	0,68	0,003	1,16	0,47	0,001	2,29	0,92	0,008
96h #2	2,51	2,49	1,80	0,72	0,090	1,86	0,75	0,003	1,69	0,68	0,001	1,96	0,79	0,008
96h #3	2,56	2,49	1,64	0,66	0,090	1,86	0,75	0,003	1,17	0,47	0,001	2,86	1,15	0,008

Tab. S19 qPCR - SQ- und p-Werte GR-Panc-1														
Gen ->	<i>GAPDH</i>		<i>GLI1</i>			<i>PTCH1</i>			<i>SHH</i>			<i>SMO</i>		
Probe	SQ	MW	SQ	SQ(GLI1)/ SQ(GAPDH)	p-Wert	SQ	SQ(PTCH1)/ SQ(GAPDH)	p-Wert	SQ	SQ(SHH)/ SQ(GAPDH)	p-Wert	SQ	SQ(SMO)/ SQ(GAPDH)	p-Wert
Ctrl #1	1,70	1,72	6,42	3,74		2,23	1,30		0,78	0,45		4,67	2,72	
Ctrl #2	1,68	1,72	4,97	2,89		2,05	1,20		0,51	0,30		4,39	2,55	
Ctrl #3	1,77	1,72	3,64	2,12		2,33	1,36		0,68	0,40		3,63	2,11	
24h #1	1,52	1,48	3,67	2,49	0,319	1,27	0,86	0,046	1,79	1,21	0,001	4,27	2,89	0,180
24h #2	1,50	1,48	3,72	2,52	0,319	1,65	1,11	0,046	1,47	1,00	0,001	4,27	2,89	0,180
24h #3	1,40	1,48	2,77	1,88	0,319	1,18	0,80	0,046	1,54	1,04	0,001	3,93	2,66	0,180
48h #1	1,49	1,45	3,37	2,32	0,174	2,56	1,76	0,004	1,78	1,23	0,000	3,41	2,36	0,396
48h #2	1,47	1,45	2,49	1,72	0,174	2,40	1,65	0,004	1,63	1,13	0,000	3,37	2,33	0,396
48h #3	1,39	1,45	2,76	1,91	0,174	2,33	1,61	0,004	1,69	1,16	0,000	3,06	2,11	0,396
72h #1	1,29	1,17	1,45	1,24	0,068	1,35	1,15	0,888	2,89	2,47	0,005	1,20	1,02	0,008
72h #2	1,20	1,17	1,65	1,41	0,068	1,49	1,27	0,888	3,68	3,14	0,005	1,55	1,33	0,008
72h #3	1,03	1,17	1,35	1,15	0,068	1,73	1,48	0,888	3,10	2,65	0,005	1,66	1,42	0,008
96h #1	1,48	1,46	2,70	1,85	0,140	1,40	0,95	0,007	3,33	2,28	0,019	1,72	1,17	0,014
96h #2	1,47	1,46	2,68	1,83	0,140	1,28	0,88	0,007	4,23	2,89	0,019	2,05	1,40	0,014
96h #3	1,44	1,46	2,53	1,73	0,140	1,38	0,94	0,007	5,18	3,54	0,019	1,97	1,35	0,014

8.5 Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name:	Philip Ferstl
Geburtsdatum:	17. März 1987
Geburtsort:	Starnberg, Bayern
Eltern:	Dr. Martina Ferstl, Radiologin Prof. Dr. Jörn Rittweger, Physiologe
Ausbildung:	Staatsexamen Humanmedizin (Note 2)
Promotion:	Voraussichtlich September 2014
Familienstand:	Ledig
Fremdsprachen (fließend):	Englisch, Spanisch
Private Interessen:	Ski, Bergsteigen, Literatur, Reisen

Werdegang

1997 – 2003	Dante-Gymnasium München
2003 – 2006	Landheim Schondorf am Ammersee
August 2005	Tamagawa-Schule, Tokyo, Japan
Juni 2006	Abitur (Note 1,5)
August 2006 – Mai 2007	Duke University, Durham, NC, USA
September 2007– Mai 2014	Philipps-Universität Marburg

Marburg, den 25.07.2014

Medizinisch relevante Tätigkeiten

Praktisches Jahr (Februar – Dezember 2013):

Allgemeinchirurgie	James Cook University – Cairns Base Hospital, QLD, Australien
Unfallchirurgie	Universitätsklinikum Marburg
Innere Medizin	Universitätsklinikum Marburg – Abteilung für Hämatologie/Onkologie; Zentrale Notaufnahme
Neurologie	Uni Zürich – Kantonsspital Aarau, Aargau, Schweiz

Famulaturen:

März 2010: Nephrologie	Klinikum München-Schwabing
August 2010: Unfallchirurgie	LKH Vöcklabruck, Österreich
März 2011: Anästhesie	Krankenhaus Dresden-Friedrichstadt
August 2012: Notaufnahme Neurologie	Universitätsklinikum Marburg

Verschiedenes:

Mai 2007	Vierwöchiges Praktikum am Department of Gastroenterology, Toronto General Hospital, ON, Kanada
September 2008	Wissenschaftlicher Assistent einer zweiwöchigen WHO-Feldstudie, Jargalant Soum und Ulan Bator, Mongolei
August 2010 – Oktober 2012	Nachtmesser im Schlaflabor des Universitätsklinikums Marburg
Oktober 2010 – September 2014	Promotion unter Prof. Dr. Matthias Ocker

8.6 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer und Dozenten an der Universität Marburg waren die Damen und Herren Prof./PD/Dr.

Aumüller, Barth, Bartsch, Baum, Baumann, Becker, Bette, Bien, Bolm, Czubayko, Daut, Decher, Donner-Banzhoff, Efe, Eikmann, Ellenrieder, Fendrich, Feuser, Fischer, Fritz, Gress, Hertl, Horn, Hoyer, Kann, Kircher, Koolman, Klose, Koehler, König, Kruse, Kubo, Lauth, Lill, Lohoff, Neubauer, Maier, Meier, Michl, Moll, Müller, Mueller, Oertel, Oliver, Opitz, del Rey, Richter, Rinné, Röhm, Rominger, Rosenow, Ruchholtz, Schäfer, Schäfer, Schmidt, Schütz, Secundo, Sevinc, Suske, Tackenberg, Thursar, Vogelmeier, Volchkov, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulff und Zemlin.

in München Herr Prof. Mann.

in Vöcklabruck Herr Prof. Köstler.

in Cairns Mr Prinsloo, MD.

und in Aarau Herr Prof. Krassen Nedeltchev.

Philip Ferstl

Marburg, den 23.07.2014

8.7 Eigene Veröffentlichungen zum Thema

Originalarbeiten

Ferstl, P., Quint, K., di Fazio, P., Montalbano, R., Lauth, M., Holz, P., Ocker, M. (2014)

The smoothened antagonist LDE225 inhibits proliferation in Gemcitabine-resistant pancreatic cancer cell lines

wird eingereicht beim Int J of Oncology

Vorträge und Präsentationen

K. Quint, P. Ferstl, R. Montalbano, P. Di Fazio, M. Ocker (2011)

The smoothened antagonist LDE225 in Gemcitabine-resistant pancreatic cancer cell lines

Postervorstellung auf den Chirurgischen Forschungstagen in Dresden

P. Ferstl, R. Montalbano, P. Di Fazio, M. Ocker, K. Quint (2011)

The smoothened antagonist LDE225 inhibits proliferation in Gemcitabine-resistant pancreatic cancer cell lines

Vortrag auf der Jahrestagung des Deutschen Pankreasclub (DPC) in Marburg

8.8 Ehrenwörtliche Erklärung

über die selbstständige Anfertigung der Dissertation:

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Der Smoothened-Antagonist LDE225 hemmt die Proliferation in Gemcitabin-sensitiven und -resistenten Zelllinien des duktales Adenokarzinoms des Pankreas“

im Institut für chirurgische Forschung unter Leitung von Prof. Dr. Matthias Ocker mit Unterstützung durch Dr. Karl Quint ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Philip Ferstl

Marburg, den 23.07.2014

8.9 Danksagung

Die vorliegende Doktorarbeit markiert den Schlusspunkt einer intensiven, lehr- und erfolgreichen Zeit, die mich als Mensch und als Mediziner sehr weitergebracht hat. Einigen Personen und Institutionen bin ich daher zu großem Dank verpflichtet.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Matthias Ocker danken für mein Promotionsthema und die hervorragenden Voraussetzungen, die er geschaffen und somit diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat. Ich möchte außerdem Herrn Dr. Karl Quint danken, dem nettesten und hilfsbereitesten Betreuer, den man sich nur wünschen kann. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Pietro di Fazio für seine große Geduld bei meinen vielen Fragen sowie bei der guten Seele unseres Labors, Susanne Lingelbach, für ihre aufopferungsvolle Hilfe bei der Zellkultur. Ohne euch alle wäre diese Arbeit nie zustande gekommen! Herrn Prof. Lauth sowie seinem Doktoranden Philipp Holz im IMT Marburg gebührt Dank für ihre Hilfe und Expertise beim Western Blot.

Ich danke weiterhin aus tiefstem Herzen:

Meinen Kommilitonen und Freunden, die die letzten sieben Jahre so sehr bereichert haben. Im selben Atemzug muss ich den AS Pirin nennen, den wohl besten Club der Welt: Schwarz-weiß wie Schnee, du schöner ASP! Danke für alles!

Der Stadt Marburg für sieben geniale Jahre.

Argentinien und ganz Lateinamerika für seine Schönheit, seine Offenherzigkeit und für seine kleinen und großen Wunder, die allerorten warten.

Frau Elisabeth Theisen sowie dem Landheim Schondorf und seinen Lehrern und Erziehern, weil sie mich mit Geduld und Weitsicht auf den richtigen Weg gebracht haben.

Peter Heilmaier sowie meinem Patenonkel Stephan Böse-O'Reilly und seiner lieben Frau Michelle, weil sie immer für mich da waren.

Meiner Familie für den großen Rückhalt, den sie mir jederzeit gegeben hat.

Meinen wundervollen Eltern für ihr riesiges Vertrauen, ihre unendliche Unterstützung während des Studiums und für alles, was sie mir ermöglicht haben. Hoffentlich freut ihr euch über das Erreichte genauso sehr wie ich.